

*На правах рукописи*

**ПЛОТНИКОВА ОЛЬГА МИХАЙЛОВНА**

**ВЛИЯНИЕ МЕТИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВНЫЕ  
ЗВЕНЬЯ ГОМЕОСТАЗА БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ**

03.01.04 – Биохимия

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Казань - 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» (РНЦ «ВТО») Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
**Лунёва Светлана Николаевна,**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Чернова Ольга Александровна**

доктор биологических наук, профессор  
**Ральченко Ирина Викторовна**

доктор медицинских наук  
**Мустафин Ильшат Ганеевич**

**Ведущая организация:**  
ГБОУВПО «Челябинская государственная медицинская академия»

**Защита диссертации состоится** « 29 » марта 2012 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан «     »                      2012 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**  
доктор биологических наук, профессор

(З.И. Абрамова)

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** В современном мире в повседневной жизни используются десятки новых не имеющих аналогов в природе органических веществ – ксенобиотиков, которые не входят в биотический круговорот, а являются прямым или косвенным продуктом хозяйственной деятельности человека. Это – химические отравляющие вещества, пестициды, детергенты, полиароматические углеводороды, синтетические красители, пищевые добавки и др. Попадая в окружающую природную среду, ксенобиотики могут нарушать обмен веществ, вызвать аллергические реакции и снижать иммунитет, изменять наследственные признаки и приводить к гибели организмов. Кроме того, вследствие биотрансформации и деградации в живых организмах и во внешней среде ксенобиотики могут образовывать не менее токсичные метаболиты (В.П. Ившин, 2005; С.А. Куценко, 2004; Е.И. Савельева, 2002; В.И. Юрин, 2001). Поэтому в настоящее время являются актуальными исследования устойчивости живых организмов к действию загрязняющих веществ антропогенного характера.

Среди загрязняющих веществ особое место занимают фосфорорганические соединения (ФОС), среди которых важнейшими являются производные алкилфосфоновых кислот, широко используемые в промышленности, строительстве, медицине, сельском хозяйстве (М.И. Кабачник, 1974; Н.Н. Мельников, 1995; Э.Е. Нифантьев, 1996). Это инсектициды карбофос, хлорофос, дихлофос и гербициды – особенно глифосат (фосфометилглицин), применяемый с невиданным размахом для борьбы с сорняками во всем мире (С. Caroline, 1998; С. Cox, 2004). К производным алкилфосфонатов относятся и фосфорорганические отравляющие вещества (зарин, зоман и ви-икс) химического оружия, которое в настоящее время планомерно широкомасштабно уничтожается в рамках выполнения ФЦП «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации».

Продуктами деструкции фосфорорганических отравляющих веществ и некоторых пестицидов, а также их метаболитами в биологических средах являются метилфосфоновая кислота (МФК), ее соли и эфиры. Эти вещества являются достаточно устойчивыми соединениями. МФК была обнаружена спустя 10 лет после загрязнения на полигоне Дагуэй, а диизопропилметилфосфонат – в грунтовых водах на территории арсенала РоккиМаунтин (США) (Е.И. Савельева, 2002; J. DeFrank, 2003; B. Frei, 1993; N.B. Munro, 1999). В силу особой устойчивости МФК принято считать одним из важнейших маркеров содержания продуктов распада ФОС в природной среде (О.Ю. Расстегаев, 2009).

Действие на теплокровные организмы этих соединений практически не изучалось в силу их малой, как считалось долгое время, токсичности. Для МФК установлена низкая токсичность для млекопитающих и водных организмов. ЛД<sub>50</sub> для крыс при пероральном введении МФК составляет 5000

мг/кг массы животного. Однако, после ряда исследований влияния МФК на дикорастущие растения, ячмень, пелюшку, мхи, некоторые тест-организмы (Т.Я. Ашихмина, 2009; С.Ю. Огородникова, 2007) абсолютная безопасность МФК стала подвергаться сомнению. Был разработан биокатализатор, способный осуществлять деградацию МФК в присутствии источника углерода с разрывом С-Р связи до фосфата, который используется клетками как источник фосфора (А.Т. Харченко, 2000; Е.Н. Efremenko, 2008).

Особое строение и свойства метилфосфоновой кислоты (МФК) – наличие малополярной фосфор-углеродной связи (С-Р-связи), близкие к фосфорной кислоте константы диссоциации, бифильность, могут приводить к ее неоднозначному влиянию на биологические объекты [С.В. Кононова, 2002; Н.Н. Мельников, 1987; Е.И. Савельева, 2002].

Малополярная  $\text{CH}_3\text{-P}$ -связь МФК способна расщепляться в определенных условиях по гомолитическому механизму с образованием свободных радикалов. Метильный и фосфонатный радикалы могут реагировать с другими радикалами как «ловушки», с активными формами кислорода с образованием более токсичных соединений, быть инициатором цепных радикальных процессов в организме даже при низких концентрациях ( $10^{-10}$ – $10^{-18}$ ). Информация о воздействии МФК и ее эфиров на метаболизм и антиоксидантную систему теплокровных животных и человека в литературе отсутствует.

Существуют отдельные данные о влиянии МФК на рост и ферментативную активность растений (С.Ю. Огородникова, 20047; Н.Н. Серебрякова, 2007). Ряд исследований, доказывающие существование микроорганизмов с С-Р-лиазной ферментативной активностью, подтверждают возможность участия веществ со связью С-Р в метаболических процессах (Е.Н. Ефременко, 2007; С.В. Кононова, 2002; И.С. Кравцов, 2006; С.В. Матыс, 2003; Е.Н. Efremenko, 2008; Т. Hidaka, 1990; J. DeFrank, 2003).

Таким образом, широкое применение производных МФК в различных сферах деятельности человека, уничтожение химического оружия и связанная с этим проблема утилизации отходов, появление фосфорорганических ксенобиотиков в компонентах природной среды в малых дозах, с одной стороны, а также уникальное строение фосфонатов, их особая реакционная способность, возможность прямого и опосредованного действия на метаболизм животных и малая изученность такого влияния, с другой стороны, вызывает необходимость детального изучения влияния этих веществ на теплокровные организмы на уровне метаболических процессов.

При этом актуальным является изучение биохимических показателей крови животных и поиск маркеров, пригодных для лабораторной диагностики и мониторинга изменения состояния животных в районах применения фосфорорганических пестицидов или уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ, где в окружающей среде могут появляться и накапливаться метилфосфонаты, обнаружение которых

аналитическими методами невозможно из-за очень низких концентраций. Важно уметь оценить влияние загрязнения в биологических объектах на самой ранней стадии, что имеет значимость как с точки зрения безопасности уничтожения ФОВ, так и с социальной стороны.

**Цель исследования.** Охарактеризовать изменения биохимических показателей метаболизма белых лабораторных мышей линии СВА после введения метилфосфоновой кислоты в различных дозах в остром, долговременном и хроническом периодах эксперимента, выявить наиболее информативные биохимические тесты, пригодные для лабораторной диагностики и мониторинга изменения состояния животных при влиянии метилфосфонатов.

**Задачи исследования.**

1. Определить значения важнейших биохимических показателей углеводного, белкового и липидного обменов, антиоксидантной системы у здоровых белых лабораторных мышей линии СВА, содержащихся в стандартных условиях вивария.

2. Изучить влияние высокой дозы МФК (2 мг/кг) на биохимические показатели углеводного, белкового и липидного обменов, АОС белых лабораторных мышей в разные сроки острого эксперимента и определить временные интервалы максимального ответа в изменениях биохимических показателей крови и тканей.

3. Выявить изменения показателей метаболизма после введения различных доз МФК в остром эксперименте и определить дозы, оказывающие наибольшее влияние.

4. Оценить возможность нормализации биохимических показателей метаболизма белых лабораторных мышей в долговременном эксперименте после однократного введения МФК в высоких и низких дозах.

5. Изучить влияние различных доз МФК в хроническом эксперименте (12 недель) на активность некоторых ферментов, характеризующих функции печени, белых лабораторных мышей при различных способах введения.

6. Показать влияние пола на биохимический статус белых лабораторных мышей линии СВА в ответ на введение МФК.

7. Определить наиболее информативные биохимические показатели углеводного, белкового и липидного обменов, антиоксидантной системы белых лабораторных мышей, которые могут быть пригодными для лабораторной диагностики и мониторинга состояния животных при влиянии МФК. Оценить роль перекисного окисления липидов и белков при воздействии ксенобиотиков с С-Р связью.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. МФК оказывает влияние на основные процессы метаболизма у лабораторных мышей, приводя к изменениям биохимических показателей, характеризующих углеводный, липидный и белковый обмен и работу антиоксидантной системы.

2. МФК обладает выраженным дозозависимым действием с максимальным влиянием на показатели метаболизма животных в диапазонах высоких и низких доз. После однократного введения высоких и низких доз МФК через 30 суток у лабораторных мышей происходит нормализация большинства показателей метаболизма.
3. Ответ на введение МФК во всех исследуемых дозах зависит от половой принадлежности животных.
4. Биохимические показатели метаболизма могут быть рекомендованы как биохимические маркеры при оценке воздействия на теплокровные организмы метилфосфонатов в высоких и низких дозах.

**Научная новизна.** Впервые комплексно исследовано влияние метилфосфоновой кислоты на важнейшие показатели обмена веществ, перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков (ПОБ), антиоксидантной системы (АОС) белых лабораторных мышей. Показано, что МФК оказывает влияние на основные процессы метаболизма у мышей линии СВА, приводя к изменениям биохимических показателей, характеризующих углеводный, липидный и белковый обмен и работу антиоксидантной системы.

Впервые выявлены закономерности в изменениях показателей метаболизма под влиянием различных доз МФК в остром, долговременном и хроническом периодах эксперимента.

Впервые обнаружено, что ответ на введение МФК во всех исследуемых дозах зависит от половой принадлежности животных. Выявлено, что в ответ на воздействие МФК организм самцов реагировал на введение МФК более реактивно, и в остром эксперименте после однократного введения МФК в дозе 2 мг/кг первый максимум в изменении исследуемых показателей в остром периоде эксперимента отмечался через 12 часов у самцов и через 24 часа у самок. Впервые изучено, что у самцов через 12 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг происходили типичные для острого стресса изменения белкового обмена, рост маркеров окислительного распада белков при снижении активности СОД, через сутки – восстановление основных показателей метаболизма, снижение продуктов окислительного распада и увеличение активности СОД. Впервые показано, что особенностью изменения показателей метаболизма у самцов и самок через 72 часа после введения высоких доз МФК являлось снижение продуктов ПОБ и ПОЛ и повышение активности эритроцитарной СОД; снижение уровня гликогена в печени при повышении содержания пирувата в сыворотке; увеличение гликогена мышц у самцов и снижение у самок; снижение у самцов активности ферментов, характеризующих функцию печени, холинэстеразы и аланинаминотрансферазы.

Впервые показано, что МФК обладает выраженным дозозависимым действием с максимальным влиянием на показатели метаболизма животных в диапазонах высоких (2 и  $10^{-3}$  мг/кг) и низких ( $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$  и  $10^{-15}$  мг/кг) доз и минимальным – на уровне средних и очень низких ( $10^{-6}$  и  $10^{-18}$  мг/кг) доз. Выявлено, что после введения низких доз МФК у самцов через 72 часа

происходило снижение уровня продуктов ПОЛ и рост продуктов ПОБ при повышении активности СОД, увеличение содержания средних молекул в плазме и эритроцитах. Изучено, что после введения низких доз МФК у самок через 72 часа активность СОД и уровень продуктов ПОБ оставались в пределах значений контрольных групп при снижении уровня продуктов ПОЛ; при этом содержание средних молекул только в эритроцитах, оставаясь в пределах нормы в плазме.

Впервые изучено влияние на мышей линии СВА высоких и низких доз МФК в долговременном эксперименте. Показано, что после однократного подкожного введения высоких и низких доз МФК через 18 суток у лабораторных мышей большинство показателей метаболизма нормализовалось. Выявлено, что через 30 суток после введения МФК в высоких и низких дозах на фоне нормализованных значений для большинства показателей метаболизма происходила активация перекисного окисления липидов и белков, а после введения МФК в низкой дозе – увеличение кетопроизводных белковых молекул.

Впервые показано, что хроническое поступление в виде подкожных инъекций в течение 12 недель высоких и низких доз МФК вызывало у самцов лабораторных мышей повышение активности АСТ, АЛТ и холинэстеразы, максимально для холинэстеразы после введения низких доз МФК. Обнаружено, что у самок, наоборот, происходило снижение активности этих ферментов, максимально для АЛТ в 1,5 раза. Выявлено, что хроническое пероральное введение различных доз МФК не приводило у самцов к значимым изменениям в активности холинэстеразы и аминотрансфераз; у самок пероральное введение МФК в низкой дозе вызывало повышение активность АСТ.

На основании полученных данных оценена возможность использования биохимических показателей метаболизма теплокровных организмов в качестве индикаторов антропогенного воздействия в районах влияния органических соединений с фосфор-углеродной связью. Впервые предложено, что в качестве биохимических показателей при оценке воздействия на теплокровные организмы метилфосфонатов в высоких и низких дозах могут быть использованы: маркеры работы АОС – продукты ПОБ в виде АФГ и КФГ, продукты ПОЛ в виде МДА в плазме, активность эритроцитарной СОД и интегральные индексы свободно-радикального окисления СОД/ПОБ и СОД/МДА; маркеры эндогенной интоксикации – ВНСММ и ОП в плазме и эритроцитах и интегральный индекс интоксикации; энергетические маркеры – тканевый гликоген, пируват и лактат в сыворотке; активность ферментов-маркеров состояния печени – холинэстеразы, аланин- и аспаратаминотрансфераз.

### **Практическая значимость работы.**

Полученные данные могут быть использованы для расширения области знаний о влиянии МФК как представителя фосфорорганических ксенобиотиков с фосфор-углеродной связью на важнейшие показатели

метаболизма, перекисного окисления липидов и белков, состояния АОС у теплокровных животных, а также по влиянию низких доз МФК. Полученные данные могут быть применены при оценке токсичности ФОС с использованием лабораторных мышей как тест-объектов.

Оценено дозозависимое действие МФК с максимальным влиянием на показатели метаболизма животных в диапазонах высоких (2 и  $10^{-3}$  мг/кг) и низких ( $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$  и  $10^{-15}$  мг/кг) доз и минимальным – на уровне средних и очень низких ( $10^{-6}$  и  $10^{-18}$  мг/кг) доз.

Оценена информативность ряда биохимических показателей метаболизма теплокровных животных, которые могут быть использованы в качестве индикаторов воздействия нерегистрируемых приборами низких концентраций ФОС. Это может быть использовано при проведении мониторинга состояния здоровья людей, работающих с ФОС или проживающих в районах применения фосфорорганических пестицидов, особенно глифосата, и расположения объектов уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ, а также при проведении экологического мониторинга животного мира для раннего обнаружения загрязнения ФОС окружающей среды.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования были использованы:

- для разработки в Межрегиональной лаборатории экотоксикологии РЦ СГЭКиМ по Курганской области трех методик, аттестованных ФГУП «Уральский научно-исследовательский институт метрологии»: «Методики выполнения измерений биохимических показателей в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом» (свидетельство об аттестации № 224.11.03.052/2009), «Методики определения гематологических показателей в крови мелких теплокровных животных микроскопическим методом» (свидетельство об аттестации № 224.11.17.025/2010), «Методики измерений активности ферментов в плазме (сыворотке) крови мелких теплокровных животных фотометрическим методом» (свидетельство об аттестации № 224.0474/01.00258/2011);

- при проведении исследований при обследовании объекта бывшего хранения химического оружия в Удмуртской Республике и мест прошлого уничтожения химического оружия в Пензенской области»;

- при проведении экотоксикологического мониторинга мелких грызунов в зонах защитных мероприятий объектов уничтожения химического оружия с фосфорорганическими отравляющими веществами в Курганской, Пензенской, Кировской областях в 2009-2011 годах.

Полученные результаты представляют практический интерес для природоохранных структур разного уровня и в дальнейшем могут стать основой для их внедрения в систему государственного экотоксикологического мониторинга химического загрязнения ФОС.

**Апробация и публикации.** Основные результаты диссертационного исследования доложены: на VII Всероссийской научно-практической



конференции «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» (Киров, 2009); на VIII Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации» (Киров, 2010); на Юбилейной научной конференции, посвященной 80-летию Химфака МГУ «Химия и общество. Грани взаимодействия: вчера, сегодня, завтра» (Москва, 2009); на международной научно-практической конференции «Экология. Риск. Безопасность» (Курган, 2010); на Всероссийской молодежной научной конференции «Биология будущего: традиции и инновации» (Екатеринбург, 2010); на международной конференции «Антропогенная трансформация природной среды» (Пермь, 2010), на научно-практической конференции, посвященной 200-летию со дня рождения Н.И. Пирогова (Курган, 2010); на Всероссийской научно-практической конференции «Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях» (Санкт-Петербург, 2010); на международной научно-практической конференции «Состояние окружающей среды и здоровье населения» (Курган, 2011); на Всероссийской научно-практической конференции «Биологический мониторинг природно-техногенных систем» (Киров, 2011); на II Международной конференции по физиологии и медицине (Санкт-Петербург, 2011); на IX Всероссийской научно-практической конференции «Зыряновские чтения» (Курган, 2011).

По теме диссертации опубликовано 63 печатных работы, в числе которых 1 монография и 10 статей в изданиях, рекомендованных ВАКом РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

**Объем и структура работы.** Работа изложена на 266 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, практических рекомендаций, выводов, списка литературы, включая 38 таблиц и 106 рисунков. Библиографический указатель включает 512 источников: из них 407 – отечественных, 105 – зарубежных. Диссертационное исследование выполнено по плану НИР ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова», номер государственной регистрации 0120.0802849.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на базе клинико-экспериментального лабораторного отдела ФГБУ РНЦ «ВТО» и Межрегиональной лаборатории экотоксикологии РЦ СГЭКиМ по Курганской области, которая аккредитована в Системе аккредитации аналитических лабораторий на техническую компетентность и независимость в проведении аналитических биохимических исследований с использованием биологического материала, полученного от мелких грызунов (аттестат аккредитации РОСС RU.0001.517720 в соответствии с ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006).

Экспериментальные исследования проведены на здоровых взрослых половозрелых белых лабораторных мышах (самцах и самках) линии СВА

(1900 животных) в возрасте 2-3 месяцев массой от 22 до 30 г с интервалом массы животных в сериях опытов  $\pm 2$  г. Материалом исследования служили мышечная ткань, печень, сыворотка и плазма крови, эритроцитарная масса крови. Мыши содержались в однотипных изолированных клетках, одновременно получали сбалансированное питание (зерно, крупы, корма животного происхождения, корнеплоды) и воду в достаточном количестве.

Исследуемые нейтрализованные гидроксидом натрия растворы МФК (реактив МФК фирмы Sigma-Aldrich Fluka, Германия) вводили животным подкожно в брюшинной области в период с 9 до 12 часов, в хроническом эксперименте применяли пероральное введение. Контрольным группам вводили эквивалентный объем физиологического раствора.

Эвтаназию проводили методом декапитации.

На проведение экспериментальных исследований получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова». Все работы с лабораторными мышами проводили согласно принципам гуманного отношения к животным в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

Для изучения влияния МФК на биохимические показатели метаболизма лабораторные мыши были разделены на пять серий: 1 серия интактных условно здоровых животных; 2 серия для установления оптимального времени максимальных и достоверных изменений изучаемых показателей; 3 серия для изучения «дозозависимого эффекта» в остром эксперименте; 4 серия для определения биохимических показателей метаболизма в долговременном эксперименте (30 суток); 5 серия для определения изменения активности некоторых ферментов после введения МФК в хроническом эксперименте (табл. 1). Внутри 1-3 серий опытов животных делили на три группы для изучения показателей белкового, липидного и углеводного обменов. В опытных и контрольных группах мышей делили на подгруппы самцов и самок.

Изучение влияния МФК в дозе 2 мг/кг на биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей проводили через 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения растворов МФК. Долговременный и хронический эксперименты проводили в течение 30 дней: долговременный – после однократного введения МФК, а хронический – при еженедельном введении МФК. При изучении «дозозависимого эффекта» мышам вводили растворы МФК из расчета  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-18}$  мг/кг массы животного, т.е. с «шагом» в три порядка, что составляет тысячные доли от ЛД<sub>50</sub> (N.B. Mungo, 1999). Опытные группы самцов и самок в зависимости от времени исследования после введения МФК обозначены как «12♂» и «12♀», «24♂» и «24♀» и т.д., и вводимой дозы – « $10^{-3}$ ♂» и « $10^{-3}$ ♀», « $10^{-6}$ ♂» и « $10^{-6}$ ♀» и т.д. (табл. 1).

Собранную цельную кровь центрифугировали при 3000 об/мин в для разделения плазмы (сыворотки) и эритроцитарной массы. В течение 15 мин после отбора крови брали на анализ печень и скелетные мышцы бедра, определение гликогена в которых проводили в течение часа после забоя животных. В цельной крови лабораторных мышей определяли число эритроцитов и количество гемоглобина в эритроцитах.

В плазме крови определяли: показатели белкового обмена – общий белок и белковые фракции (альбумин и  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулины); показатели эндогенной интоксикации и перекисного окисления белков – олигопептиды (ОП) и вещества низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) в плазме и эритроцитах, продукты перекисного окисления белков (ПОБ) в белковом осадке в виде альдегидо- и кето-2,4-динитрофенилгидразонов (АФГ и КФГ); показатели липидного обмена и перекисного окисления липидов (ПОЛ) – общие липиды, общий холестерин, триглицериды, малоновый диальдегид (МДА); активность ферментов – каталазы, аланин- и аспаратаминотрансфераз, холинэстеразы. Общий белок определяли спектрофотометрически биуретовым методом Кингслея-Вейксельбаума при 540 нм; электрофоретическое разделение белковых фракций проводили на системе Paragon (Beckman, США). В супернатанте определяли олигопептиды методом Лоури с регистрацией оптической плотности окрашенных комплексов при 750 нм; ВНСММ – путем регистрации спектра поглощения в ультрафиолете в диапазоне 238-298 нм с шагом в 1 нм по методу М.Я. Малаховой (1987); продукты ПОБ – в белковом осадке после осаждения трихлоруксусной кислотой по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином – при 270 нм АФГ, при 363 и 370 нм КФГ. Общие липиды определяли спектрофотометрически с фосфованилиновым реактивом при  $\lambda=540$  нм; общий холестерин – энзиматическим колориметрическим метод Триндера с 4-аминоантипирином при  $\lambda=500$  нм; триглицериды – энзиматическим методом с помощью набора реактивов «Триглицериды-Ново» фирмы «Вектор-БЭСТ» (г. Новосибирск); содержание МДА – по реакции с тиобарбитуровой кислотой при 532 нм. Для определения активности ферментов в плазме использовали: для каталазы – метод М.А. Корольюка, основанный на определении скорости разложения перекиси водорода; для АСТ и АЛТ – унифицированный кинетический УФ-метод, основанный на реакциях переаминировании с дальнейшим восстановлением оксалоацетата или пирувата с участием НАДН; для холинэстеразы – кинетический метод с гексацианоферратом (III) калия в качестве хромогена.

Таблица 1

Серии	Группы	Особь лабораторных мышей						Кол-во особей	
<u>1 серия</u> Референтные значения	Интактные группы, здоровые животные	60 ♂						120	
		60 ♀							
<u>2 серия</u> Установление времени максимального изменения изучаемых показателей	Группы	Срок эксперимента						720	
		12 ч	24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	120 ч		
	Опытные группы, введение МФК в дозе 2 мг/кг массы	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂		
		3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀		
	Контрольные группы, введение физраствора	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂		
		3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀		
<u>3 серия</u> Изучение дозозависимого эффекта	Группы	Дозы МФК, мг/кг						480	
		10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-15</sup>	10 <sup>-18</sup>		
	Опытные группы, введение МФК в различных дозах	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂	3•10 ♂		
		3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀	3•10 ♀		
	Контрольные группы, введение физраствора	3•20 ♂							
		3•20 ♂							
<u>4 серия</u> Изучение периода нормализации биохимических показателей	Группы	Доза МФК, мг/кг	Срок эксперимента					300	
			3 сут	6 сут	12 сут	18 сут	30 сут		
	Опытные группы, белковый обмен	10 <sup>-3</sup>	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂		
		10 <sup>-15</sup>	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂	10 ♂		
	Опытные группы, углеводный обмен	10 <sup>-3</sup>	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀		
		10 <sup>-12</sup>	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀		
	Опытные группы, липидный обмен	2	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀		
		10 <sup>-15</sup>	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀	10 ♀		
	Контрольные группы, введение физраствора	-	2•10 ♂	10 ♂	10 ♂	-	-		
		-	4•10 ♀	2•10 ♀	2•10 ♀	-	-		
<u>5 серия</u> Изучение активности печеночных ферментов	Острый эксперимент	Дозы МФК, мг/кг						280	
		2	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-12</sup>	10 <sup>-15</sup>		10 <sup>-18</sup>
	Опытные группы, введение МФК в различных дозах	20 ♂	20 ♂	20 ♂	20 ♂	20 ♂	20 ♂		
	Контрольная группа	20 ♂							
	Хронический эксперимент	Доза МФК 10 <sup>-3</sup> мг/кг			Доза МФК 10 <sup>-15</sup> мг/кг				
	Внутримышечное введение МФК	10 ♂		10 ♀		10 ♂			10 ♀
	Пероральное введение МФК	10 ♂		10 ♀		10 ♂			10 ♀
	Контрольные группы	10 ♂ и 10 ♀							
Всего животных в эксперименте:								1900	

В печени количественное определение гликогена проводили с антроновым реактивом прямым методом, в мышцах – после двукратного переосаждения спиртом. В скелетных мышцах содержание креатина определяли по реакции с диацетилом, креатинфосфата – по содержанию фосфора в безбелковом экстракте.

В сыворотке крови определяли содержание продуктов гликолиза – пирувата (ПВК) и лактата, а также активность ферментов – лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы (КК). Определение концентрации ПВК проводили модифицированным методом Умбрайт при 440 нм, лактата – энзиматическим методом с 4-аминоантипирином при 505 нм. Активность ферментов ЛДГ и КК определяли спектрофотометрическим методом при  $\lambda=340$  нм с помощью наборов фирм DiaSys Diagnostic и Vital Diagnostic (Россия) соответственно.

В эритроцитах определяли активность СОД по реакции, основанной на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметсульфата, за единицу активности СОД принимали количество фермента необходимого для 50% ингибирования реакции восстановления НСТ (Г.И. Назаренко, 2006; В.С. Камышников, 2004).

Статистическую обработку данных проводили с использованием критериев непараметрической статистики: при исключении выбросов использовали метод Титъена-Мура, проверяя минимум и максимум значений выборки; достоверность различий между двумя выборками определяли по W-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни для независимых выборок. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали менее 0,05. Результаты анализов усредняли с помощью медианы, на основании которой считали различия в процентах (%) опытных и контрольных групп. Корреляционную зависимость между выборками, подчиняющимися нормальному распределению, оценивали по критерию Пирсона, не подчиняющимся закону распределения – по критерию Кендалла. Результаты корреляционного анализа представляли в виде коэффициента корреляции с уровнем значимости  $p<0,05$  и уравнения регрессии. Факторный анализ проводили методом главных факторов, метод оценки общностей – анализ главных компонент (Гайдышев, 2001; Гланц, 1998). Для облегчения интерпретируемости факторов матрицу факторных коэффициентов преобразовывали методом Varimax-вращения в матрицу факторного отображения. При статистической обработке результатов исследования был использован интегратор модульной программы AtteStat 1.0 для программы Microsoft Excel, разработанный в лаборатории информационно-вычислительного центра ФГУН «РНЦ «ВТО» им. академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации И.П. Гайдышевым.

## Результаты исследования

### Особенности изменений показателей метаболизма белых лабораторных мышей после введения метилфосфоновой кислоты в дозе 2 мг/кг в разные сроки острого эксперимента.

В течение первых суток острого эксперимента реакция организма животных в ответ на введение МФК напрямую ярко зависела от половой принадлежности.

В остром эксперименте через 12 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг у самцов наблюдали типичные для острого стресса изменения биохимических показателей: гиперпродукцию альфа- и бета-глобулинов при уменьшении гамма-глобулиновой фракции на 35% (рис. 1), увеличение содержания ОП в эритроцитах в 2 раза и ВНСММ в плазме в 1,4 раза с резким увеличением катаболической фракции, рост маркеров окислительного распада белков – продуктов ПОБ, особенно кетопроизводных – в 1,9 раза (рис. 2).

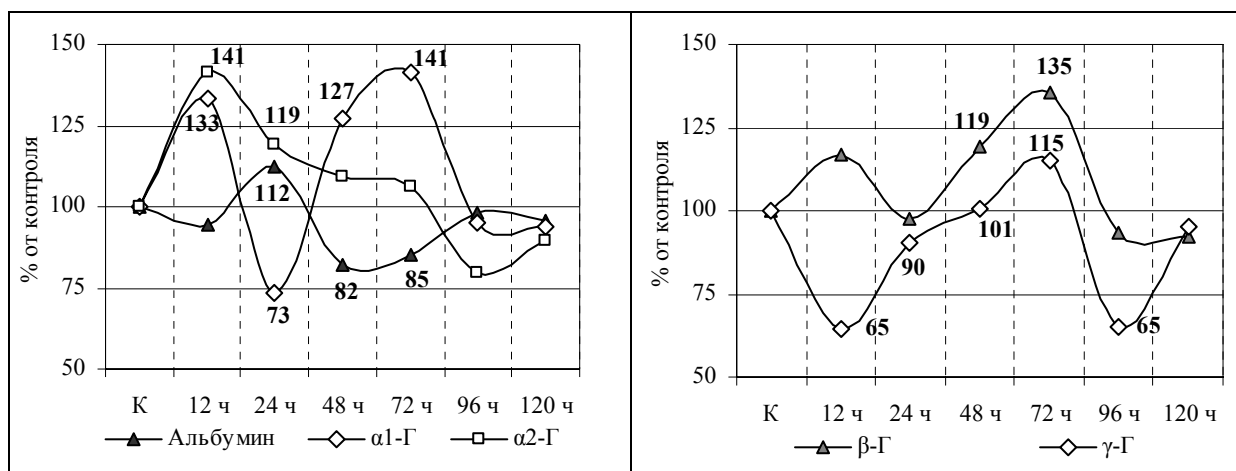


Рис. 1. Изменение содержания белковых фракций в плазме крови самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание: К – контрольная группа; по оси абсцисс – срок окончания эксперимента после введения МФК; значения отличий в процентах указаны в случае статистически значимых различий при  $p < 0,05$ .

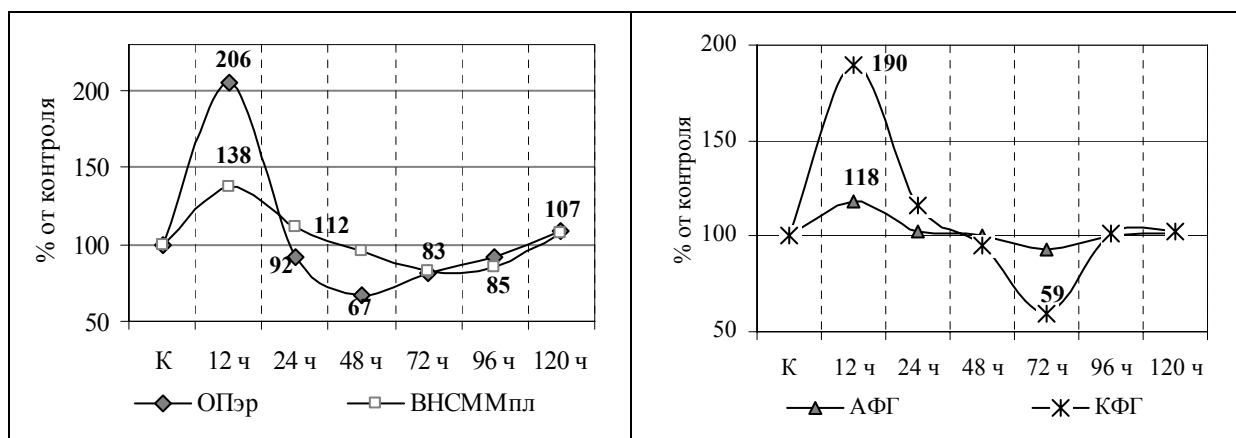


Рис. 2. Изменение содержания ВНСММ в плазме и ОП в эритроцитах, продуктов ПОБ в виде АФГ и КФГ в плазме крови самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

Наблюдаемые изменения происходили при снижении активности СОД на 22% и указывали на развитие синдрома эндогенной интоксикации за счет накопления эндотоксинов, что подтверждает возросший в 1,9 раза индекс интоксикации (рис. 3); при этом рост ВНСММ в плазме предполагает ускорение биотрансформации (утилизации) ОП до более мелких молекул, а снижение уровня ВНСММ в эритроцитах в это время указывает, скорее всего, об успешной работе детоксицирующей функции печени. Характеризующий соотношение основного ферментного антиоксидантного фактора с показателем патогенного действия свободных радикалов функциональный показатель свободно-радикального окисления СОД/ПОБ был снижен на 37% в отличие от СОД/МДА, который имел тенденцию к росту из-за уменьшившегося на 47% уровня продуктов ПОЛ.

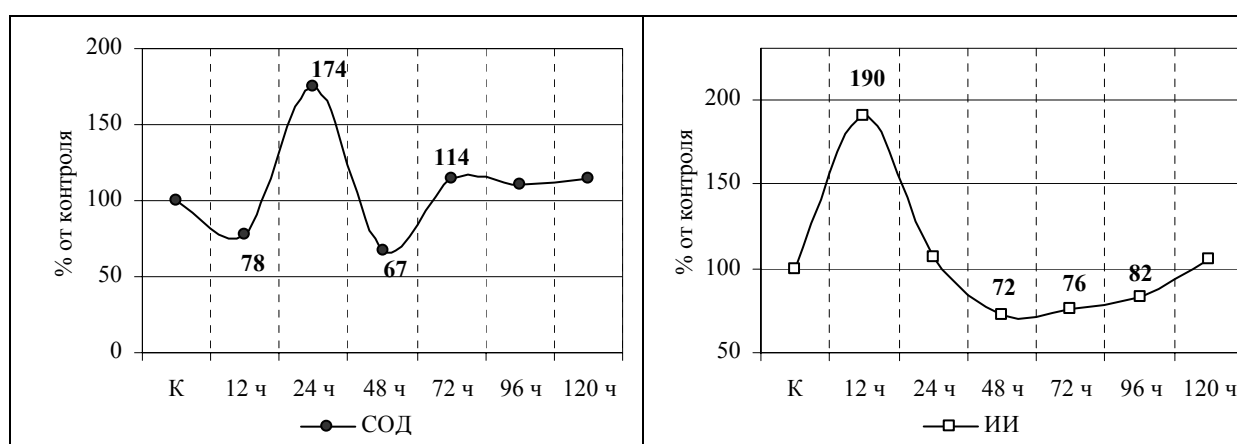


Рис. 3. Изменение активности СОД и индекса интоксикации в плазме крови самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

Для важнейших энергетических субстратов гликолиза – гликогена в печени и мышцах, ПВК в сыворотке крови, идущих, в том числе, для обеспечения специфической и неспецифической резистентности организма, через 12 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг у самцов отмечалось снижение их уровня, сопровождающееся значительным повышением активности КК (рис. 4).

Через 24 часа после введения МФК происходило восстановление уровня гликогена печени и мышц при увеличении скорости гликолиза (уровень ПВК увеличивался в 1,38 раза) и уменьшении роли креатинкиназного пути энергообеспечения мышц. Обращает на себя внимание, что активность ЛДГ после введения МФК в дозе 2 мг/кг менялась недостоверно или незначительно при любом сроке эксперимента (рис. 4) что связано, видимо, с особой ролью ЛДГ в регулировании состояния протонного пула, влияющего на pH плазмы.

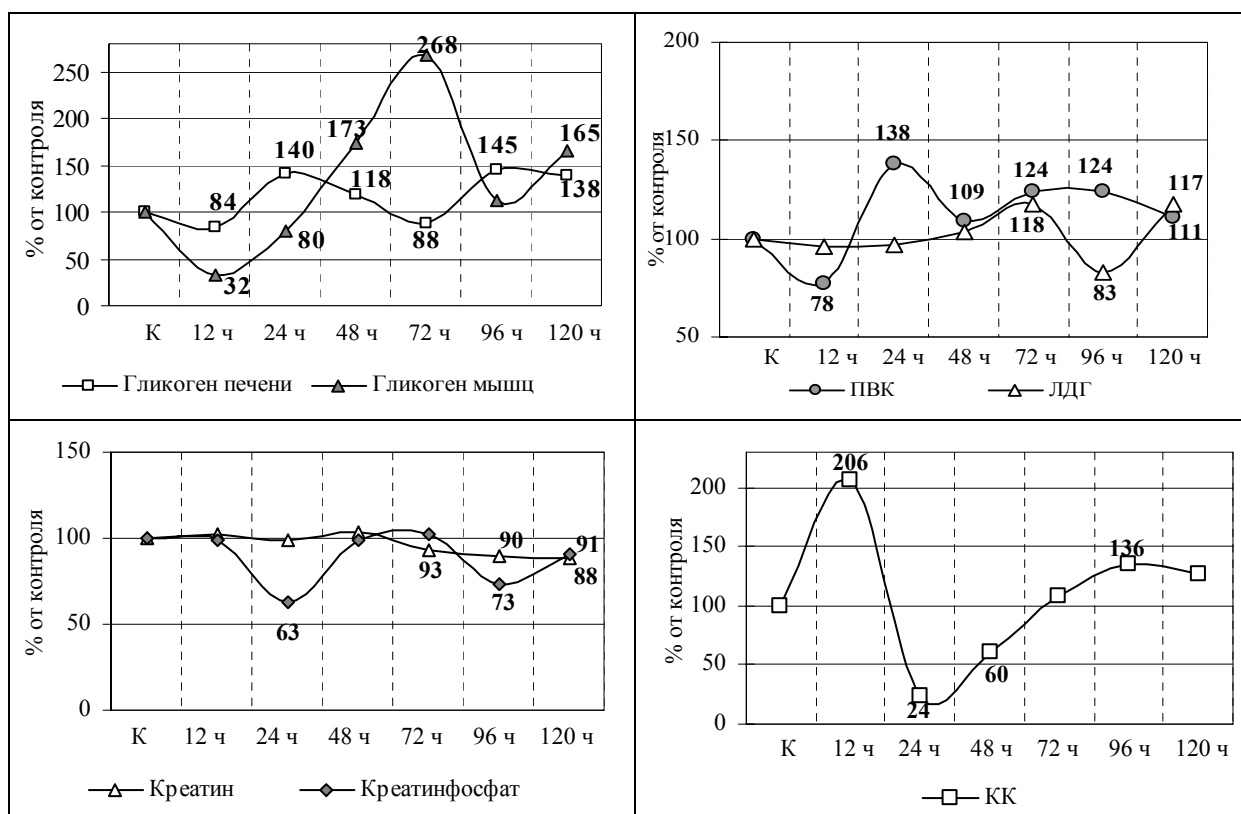


Рис. 4. Изменение содержания гликогена в печени и мышцах, ПВК, активности ЛДГ, КК в сыворотке крови, креатинфосфата и креатина самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

К концу первых суток происходило постепенное уменьшение белков острой фазы (рис. 1) и продуктов ПОБ (рис. 2) при значительном (в 1,7 раза) увеличении активности СОД (рис. 3). Одновременное уменьшение содержания средних молекул и ОП в эритроцитах и повышение ОП в плазме указывало на накопление продуктов распада белковых молекул (рис. 5). Катаболическая составляющая средних молекул была после введения МФК в дозе 2 мг/кг максимально (в 1,76 раза) повышена.

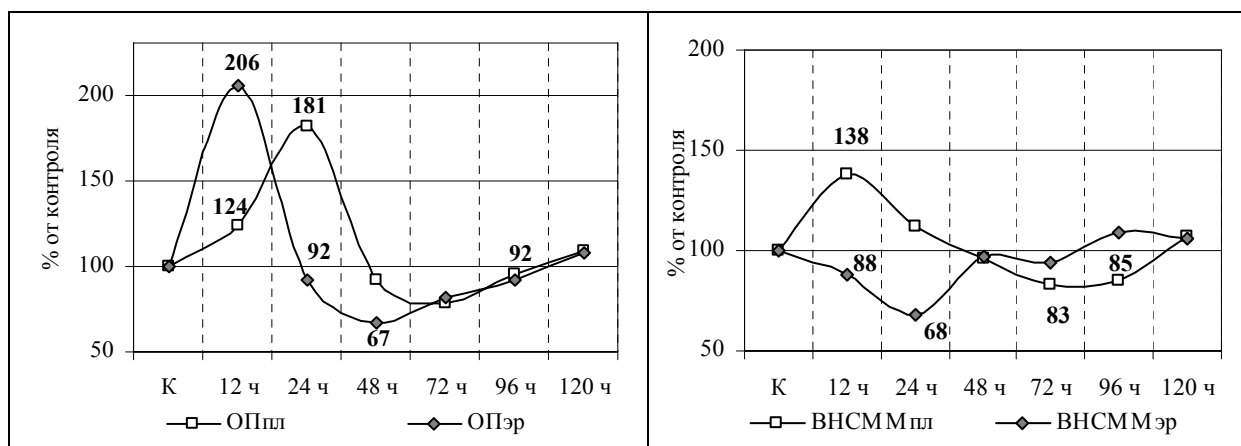


Рис. 5. Изменение содержания олигопептидов (ОП) и веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) в плазме и эритроцитах крови самцов в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

В отличие от самцов у самок через 12 часов после введения МФК отмечена лишь гипер- $\gamma$ -глобулинемия, сопровождаемая снижением  $\alpha$ 1-



глобулинов, а также незначительное повышение ОП и средних молекул в плазме при снижении их в эритроцитах (рис. 6).

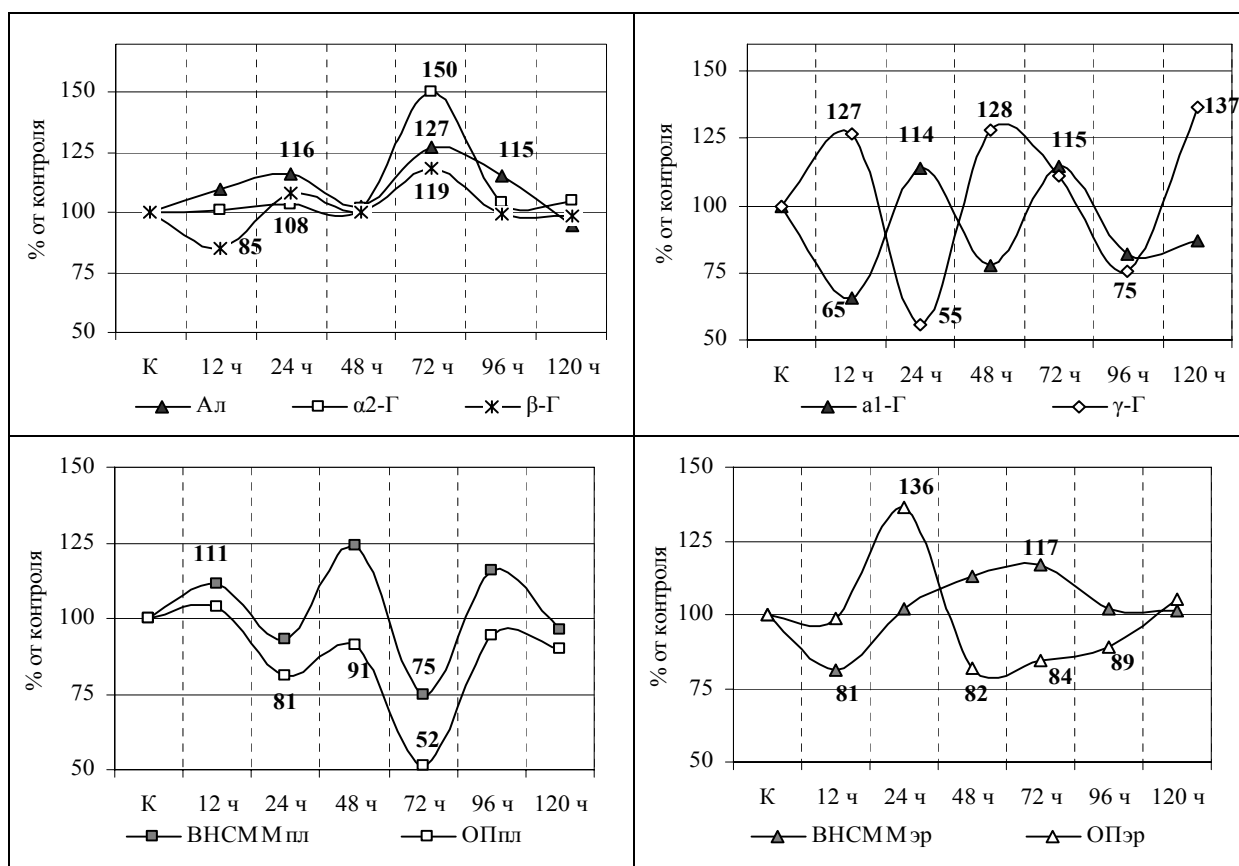


Рис. 6. Изменение содержания альбумина (Ал) и α1-, α2-, β-, γ-глобулинов, ОП и ВНСММ в плазме и эритроцитах крови самок в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

В это же время происходило уменьшение продуктов ПОБ при снижении активности СОД в 2 раза (рис. 7). Содержание МДА было в пределах нормы. Однако пониженные функциональные показатели свободно-радикального окисления (ФП СРО) – СОД/МДА в 2 раза, СОД/ПОБ в 1,6 раза указывали на разрушительное действие свободных радикалов.

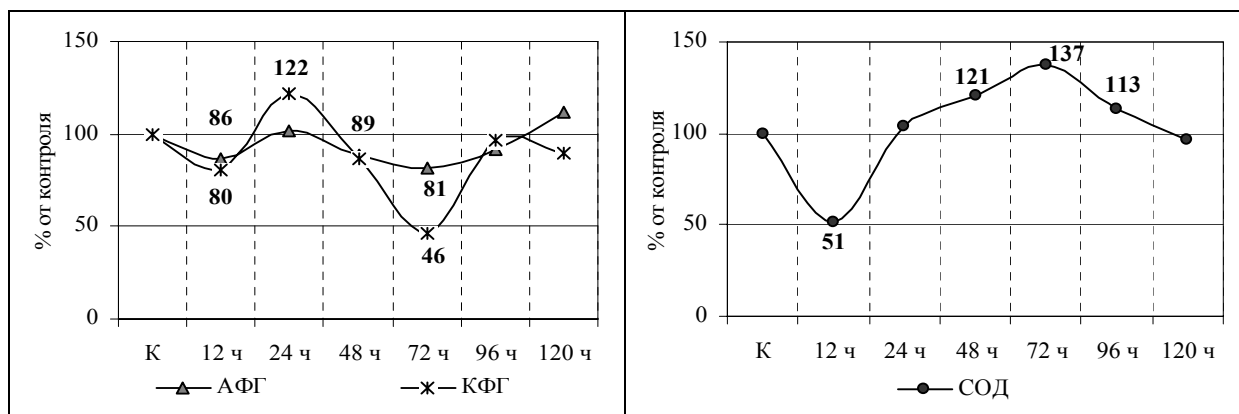


Рис. 7. Изменение содержания продуктов ПОБ в виде АФГ и КФГ в плазме и активность СОД в эритроцитах крови самок в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

Из энергетических субстратов у самок через 12 часов после введения МФК изменялось (уменьшалось на 10-30%) только содержание легко мобилизуемых по анаэробному пути креатина и КрФ (рис. 8).

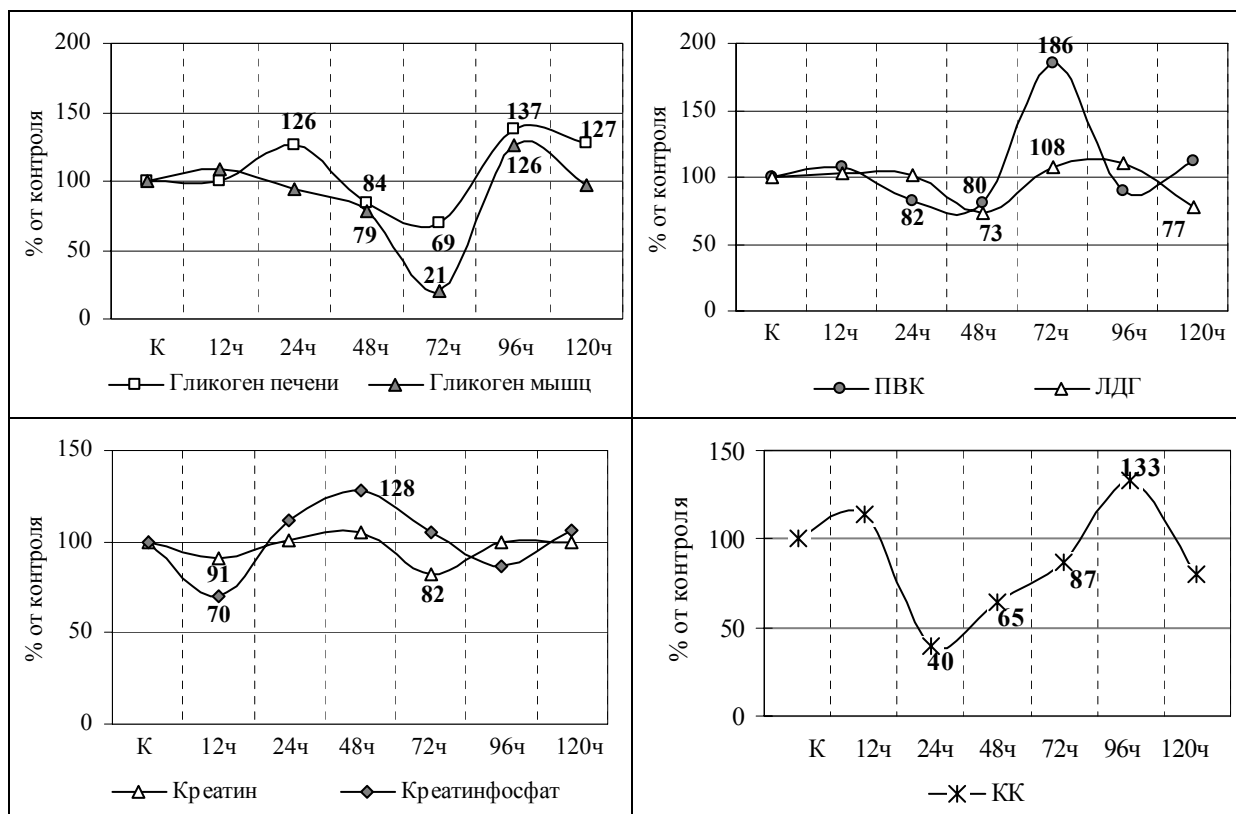


Рис. 8. Изменение содержания гликогена в печени и мышцах, пирувата, активности ЛДГ и креатинкиназы в сыворотке, креатина и креатинфосфата в мышцах у самок в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание см. рис. 1.

Через 24 часа после введения МФК у самок отмечено небольшое увеличение уровня альбуминов и острофазовых белков при снижении  $\gamma$ -глобулиновой фракции (рис. 6). В это же время активность СОД оставались в пределах значений в контрольной группе, а уровень кетопроизводных в плазме (рис. 7) и ОП в эритроцитах нарастали (рис. 6), свидетельствуя об окислительной модификации белков.

Значения большинства показателей, как у самцов, так и у самок, через 48 часов после введения МФК либо достоверно не отличались от контроля, либо отличалось от таковых не более чем на 20%. Для самцов было отмечено гипер- $\alpha$ 1-глобулинемия, рост уровня общих липидов и гликогена в тканях, особенно в мышцах (в 1,7 раза), а для самок – гипо- $\alpha$ 1-глобулинемия при росте  $\gamma$ -глобулиновой фракции, снижение уровня общих липидов и гликогена в тканях. Со стороны работы АОС у самцов было отмечено снижение активности СОД при пониженном на треть ФП СРО (СОД/ПОБ и СОД/МДА); а у самок – повышенная активность СОД, способствовавшая снижению уровня всех продуктов перекисного окисления и повышению ФП СРО в 1,5-1,8 раза.

Через 72 часа после введения МФК в дозе 2 мг/кг у самцов и самок наблюдался второй максимум в изменениях изучаемых показателей.

У самцов через трое суток после введения МФК в дозе 2 мг/кг развивалась гиперглобулинемия при понижении уровня альбумина, как основного резервного белка в организме (рис. 1), что связано, скорее всего, с ускорением его катаболизма для высвобождения аминокислотного пула, необходимого для достаточного синтеза острофазовых белков в печени. Уровень ОП и средних молекул в крови самцов был также понижен (рис. 5). Об активации работы АОС в это время свидетельствуют высокие показатели свободно-радикального окисления (рис. 9) за счет пониженного уровня продуктов ПОБ и ПОЛ при повышенной активности СОД (рис. 3).

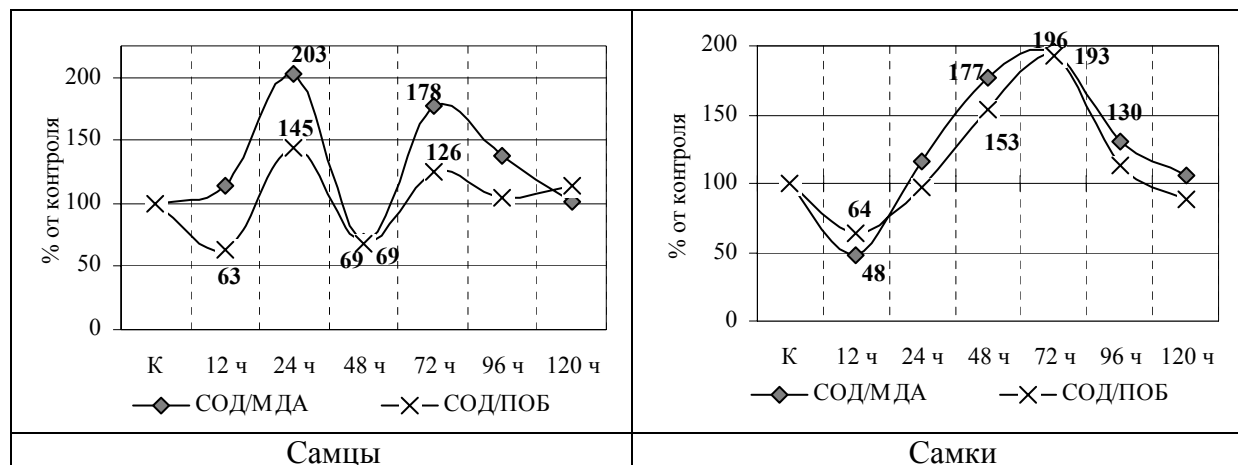


Рис. 9. Изменение показателей СОД/МДА и СОД/ПОБ в крови самцов и самок в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг. Примечание рис. см. 1.

У самок гиперпродукция глобулинов была менее выражена на фоне повышения уровня альбуминов (рис. 6), ответственных за транспорт, в том числе эндотоксинов, таких как, ОП, средние молекулы, продукты ПОБ в плазме – у самок их уровень был ниже, чем у самцов. При повышении активности СОД (рис. 7) это предполагает в ответ на введение МФК более эффективную работу АОС (интегральные индексы свободно-радикального окисления возросли почти в 2 раза, рис. 9). Увеличение уровня ВНСММ в эритроцитах на фоне снижения этих веществ в плазме у самок (рис. 6), очевидно, указывает на достаточную сорбционную емкость эритроцитов.

Через трое суток после введения МФК в дозе 2 мг/кг у самцов и самок происходила активация гликогенолиза и гликолиза – уровень гликогена в печени падал с одновременным увеличением содержания ПВК и активности ЛДГ в крови. Однако при этом в скелетных мышцах у самцов активизировались анаболические процессы, а у самок – расход мышечного гликогена со снижением его уровня почти в 5 раз (рис. 4, 8).

Влияние МФК в период 96-120 часов после ее введения в организм животных минимизировалось. У самцов и самок через 120 часов после введения МФК в дозе 2 мг/кг показатели, указывающие на белковую деградацию, имели недостоверно отличающиеся значения по сравнению с контрольными группами. Однако для самцов повышенный уровень МДА при снижении уровня общих липидов и холестерина на 20-25%

свидетельствовали о влиянии окислительного стресса при позднем сроке эксперимента на липидные компоненты плазмы крови. У самцов преобладали процессы образования гликогена в тканях – повышение составило 138 и 165% в печени и мышцах соответственно; содержание ПВК и активность ЛДГ в сыворотке были повышены на 10-20% при уменьшении уровня субстратов креатинфосфатного энергообеспечения в мышцах (рис. 4). У самок в этот период отмечен повышенный в 1,27 раза уровень печеночного гликогена и при незначительном, но достоверном росте альбумина гипер-γ-глобулинемия (рис. 6, 8).

В целом анализ изменений биохимических показателей метаболизма лабораторных мышей после подкожного введения МФК в дозе 2 мг/кг в разные периоды острого эксперимента показал, что в ответ на воздействие МФК организм самцов реагировал на введение МФК более реактивно, а для самок по сравнению с самцами характерна большая стресс-устойчивость.

Максимальные отклонения значений изучаемых показателей относительно контроля наблюдалось через 72 часа, что наглядно было показано при применении коэффициента, характеризующего степень изменений (рис. 10). Поэтому следующий этап работы – дозозависимый эксперимент – проводили через 72 часа.

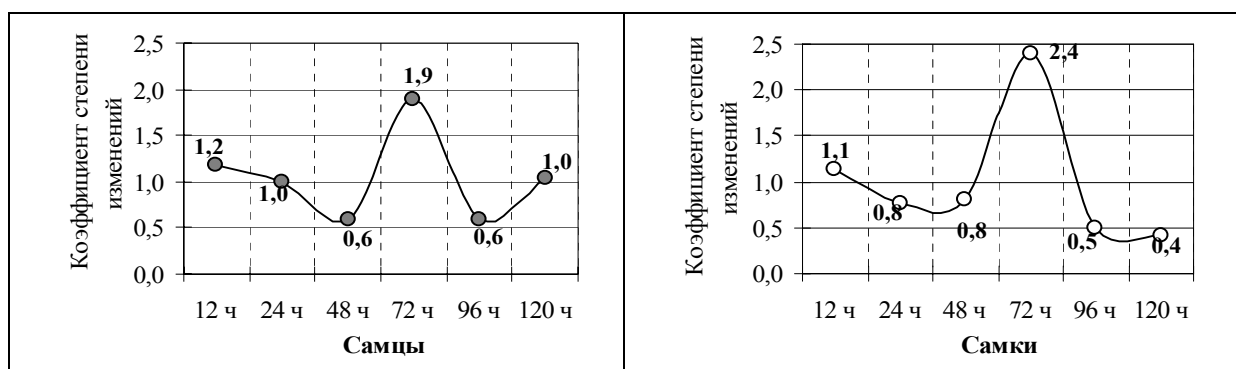


Рис. 10. Изменение рассчитанного коэффициента степени изменений биохимических показателей в зависимости от времени после введения МФК в дозе 2 мг/кг.

**Особенности изменений показателей метаболизма белых лабораторных мышей через 72 часа после введения различных доз метилфосфоновой кислоты.** При изучении дозовой зависимости нами было отмечено, что у самцов и самок лабораторных мышей в ответ на введение различных доз МФК изменения в содержании общего белка и белковых фракций были, в основном, схожими, но менее выраженными у самок (рис. 11). Уровень общего белка у самцов и у самок был повышен на 10-15% после введения всех доз МФК, а уровень альбумина был в пределах значений в контрольных группах и различался лишь после введения МФК в высокой (2 мг/кг) дозе – у самцов он понижался, а у самок на почти треть повышался. Основные изменения в белковом обмене в ответ на введение различных доз МФК через 72 часа у самцов происходили за счет всех фракций глобулинов, а у самок было отмечено увеличение глобулинов острофазовых альфа2- и бета- фракций при снижении уровня гамма-глобулинов при действии низких

доз МФК, что наблюдается, как правило, при иммунодефицитных состояниях (рис. 11).

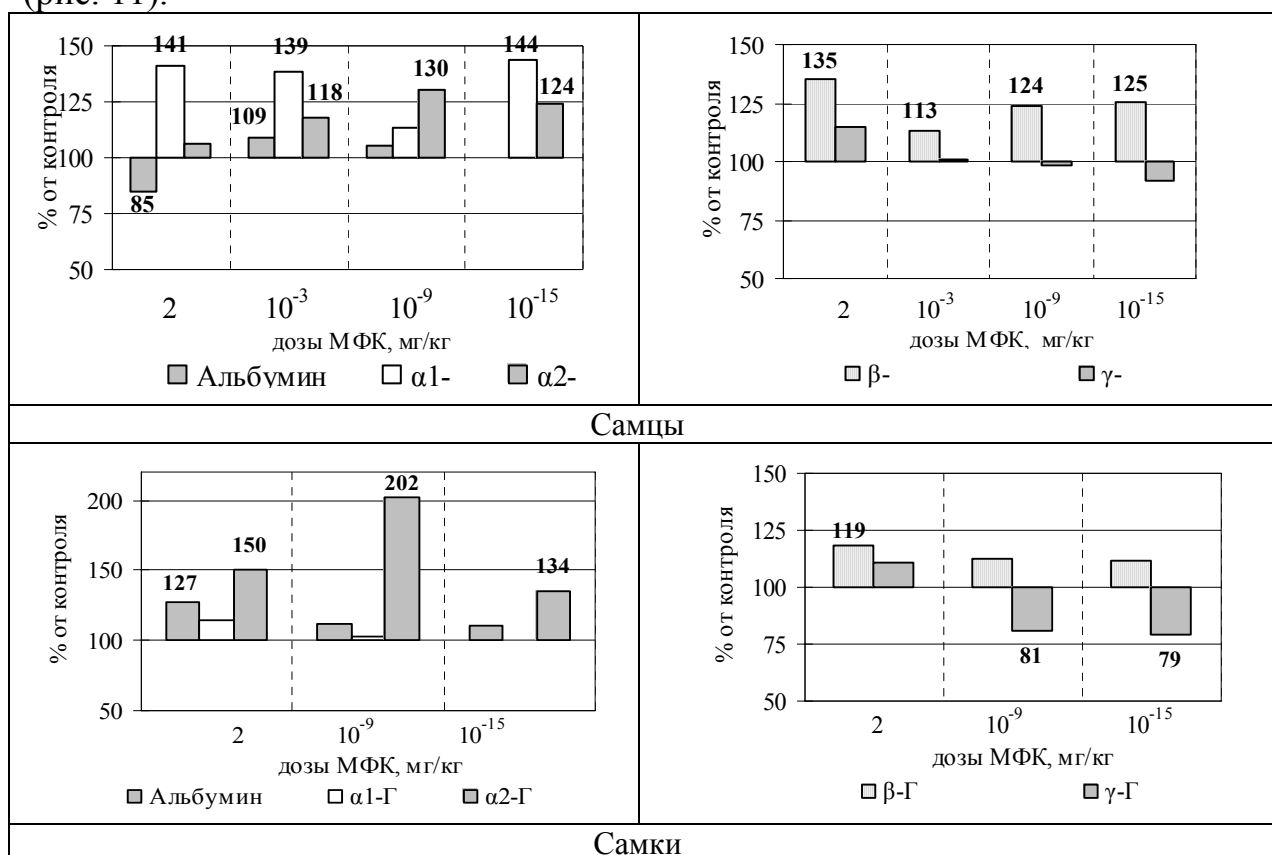


Рис. 11. Изменение содержания белковых фракций: альбумина, α1-, α2-, β-, γ-глобулинов в плазме крови самцов и самок через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание: указаны проценты в случае достоверных отличий при  $p < 0,05$ .

Характеризуя работу АОС и глубину протекания процессов ПОЛ и ПОБ, было отмечено, что после введения различных доз МФК у самцов активность СОД была повышена – на 14-18% под действием высоких доз и на 28-57% под действием низких доз МФК (рис. 12).

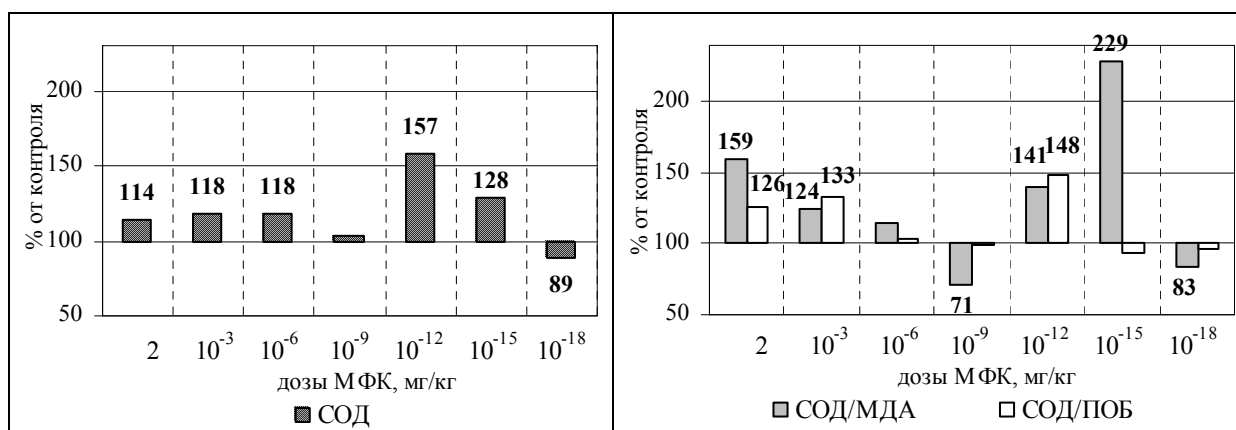


Рис. 12. Изменение активности СОД в эритроцитах крови самцов и показателей свободно-радикального окисления белков и липидов (СОД/ПОБ и СОД/МДА) через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Концентрация продуктов перекисного окисления белков и липидов в плазме крови самцов под действием высоких доз МФК существенно

снижались (рис. 13). Вероятно, МФК в высоких дозах выступает как ловушка свободных радикалов. Повышенная в 1,57 раза активность СОД после введения МФК в дозе  $10^{-12}$  мг/кг сдерживала рост продуктов перекисного окисления и белков и липидов, содержание которых не отличалось от значений в контрольных группах. Повышение активности СОД в 1,28 раза после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг, тем не менее, не способствовало снижению уровня продуктов ПОБ в виде АФГ и КФГ, содержание которых увеличилось в 1,35 и 1,77 раза соответственно. Однако при этом происходило уменьшение МДА. Функциональные показатели свободно-радикального окисления были, в основном, повышены, что является хорошим прогностическим фактором (рис. 12). Увеличение продуктов ПОБ наряду с увеличением активности СОД свидетельствовало, скорее всего, о появлении дополнительного источника радикального влияния, которым стала МФК – источник свободных радикалов ( $\bullet\text{CH}_3$  и  $\bullet\text{PO}_3\text{H}_2$ ) при разрыве С-Р связи. Образовавшиеся радикалы  $\bullet\text{CH}_3$  и  $\bullet\text{PO}_3\text{H}_2$  выступили, по-видимому, как «ловушки» радикалов с обрывом цепи радикальных процессов ( $\bullet\text{CH}_3 + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$  и  $\bullet\text{PO}_3\text{H}_2 + \bullet\text{OH} \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_4$ ), и как источники электронов с образованием супероксидного анион-радикала  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $\bullet\text{PO}_3\text{H}_2 - e + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_3\text{PO}_4$  или  $\bullet\text{CH}_3 + \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$ ).

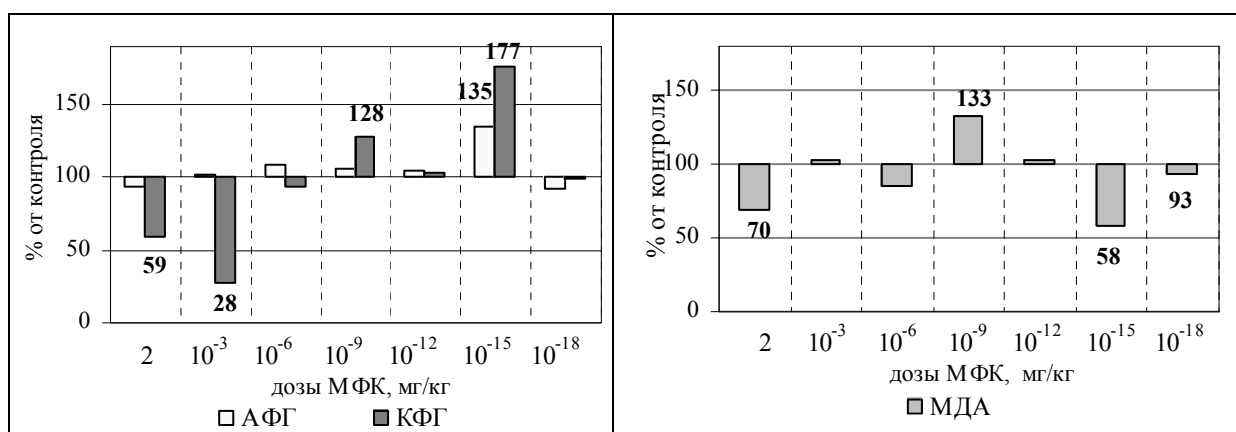


Рис. 13. Изменение содержания продуктов ПОБ (в виде АФГ и КФГ) и ПОЛ в виде МДА в плазме крови самцов через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Анализ изменений маркеров эндогенной интоксикации в крови самцов лабораторных мышей показал, что введение различных доз МФК приводило к повышенному образованию ОП, уровень которых в плазме был всегда выше, чем в эритроцитах (рис. 14).

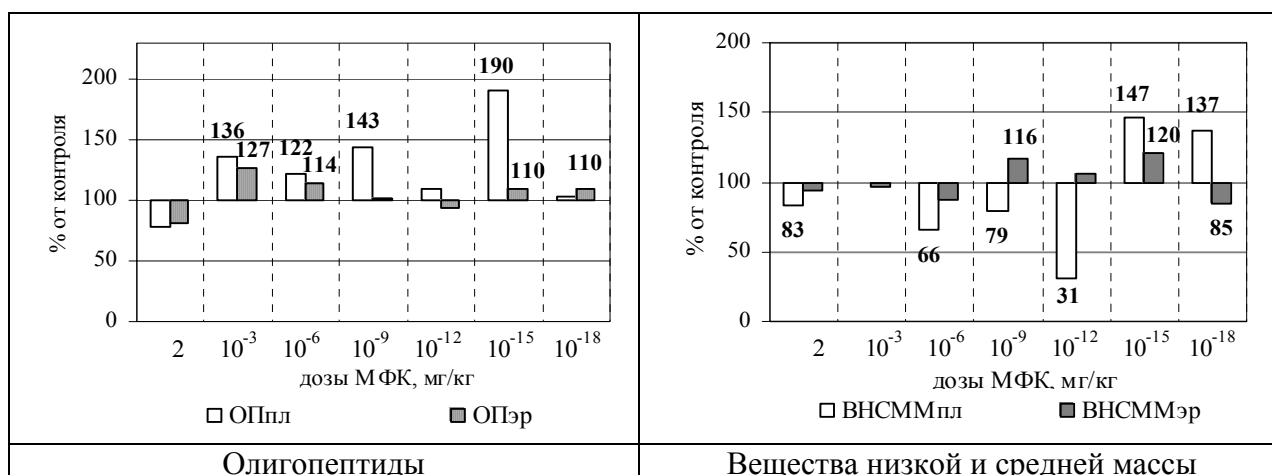


Рис. 14. Изменение содержания ОП и ВНСММ в плазме и эритроцитах крови самцов через 72 часа после введения МФК в различных дозах. Примечание см. рис. 11.

Одновременное повышение содержания ВНСММ в плазме и эритроцитах на 47 и 20% соответственно было отмечено у самцов только после введения низкой ( $10^{-15}$  мг/кг) дозы МФК, повышение в плазме происходило за счет катаболической составляющей, уровень которой возрастал в 1,5 раза. Этот факт вкупе с особенно резким повышением уровня ОП в плазме самцов при незначительном росте в эритроцитах (при дозе МФК  $10^{-15}$  мг/кг) свидетельствовало об усилении интоксикации.

У самок достоверно активность СОД повышалась только в ответ на воздействие высоких доз МФК (на 137 и 114% после введения МФК в дозах 2 и  $10^{-3}$  мг/кг соответственно) (рис. 15).

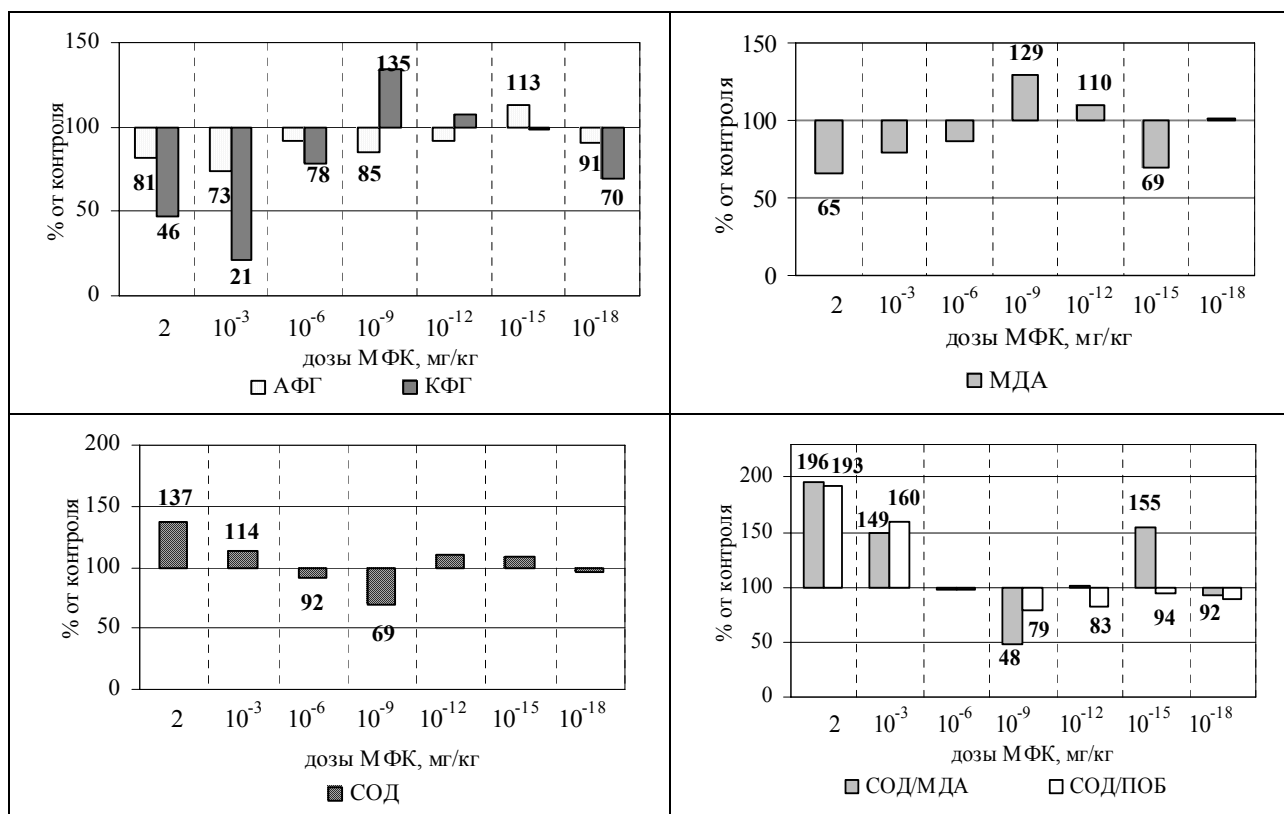


Рис. 15. Изменение содержания продуктов ПОБ в виде АФГ и КФГ и ПОЛ в виде МДА в плазме, активности СОД в эритроцитах крови самок и показателя свободно-радикального окисления через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Это сопровождалось существенным снижением продуктов перекисного окисления белков и липидов – на 19-27% альдегидопроизводных, 54-79% кетопроизводных, на 20-35% МДА. Повышение на треть продуктов перекисного окисления при снижении активности СОД происходило лишь при действии МФК в дозе  $10^{-9}$  мг/кг. В дозе  $10^{-15}$  мг/кг у самок в отличие от самцов активность СОД повышалась незначительно, что сопровождалось небольшим ростом продуктов окисления белков до альдегидопроизводных (повышение АФГ на 13%) при снижении продуктов ПОЛ в виде МДА в 3 раза. По-видимому, это указывает на более эффективную работу АОС у самок и наличие у них более гибких адаптивных систем, что позволяет лучше приспосабливаться к действующему негативному фактору.

У самок введение МФК не вызывало столь значительного образования ОП как у самцов, особенно в плазме, а после введения МФК в дозе 2 мг/кг отмечено даже снижение их уровня в плазме в 2 раза (рис. 16). В отличие от самцов, МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг привело к увеличению ОП только в плазме на 30%. В этой же дозе МФК способствовала накоплению средних молекул только в эритроцитах – в 1,4 раза за счет катаболической составляющей. Накопление средних молекул у самок в основном в эритроцитах является свидетельством, скорее всего, нормального функционирования гликокаликса эритроцитов как переносчиков эндотоксинов.

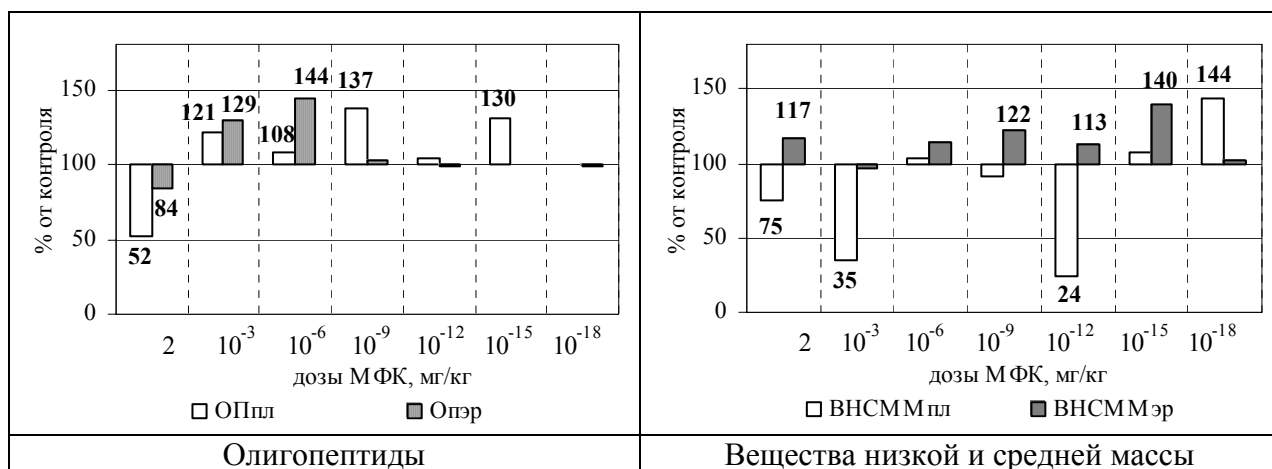


Рис. 16. Изменение содержания ОП и ВНСММ в плазме и эритроцитах крови самок через 72 часа после введения МФК в различных дозах. Примечание см. рис. 11.

Эти данные позволили нам утверждать, что самцы более подвержены влиянию МФК, особенно в низкой дозе – для них характерно развитие синдрома эндогенной интоксикации. Так, после введения дозы МФК  $10^{-3}$  мг/кг индекс интоксикации (ИИ) у самцов возрастал в 1,4, у самок падал в 1,2 раза; после введения низкой дозы МФК ( $10^{-15}$  мг/кг) у самцов ИИ возрастал в 2,3, а у самок – только в 1,4 раза (рис. 17). Тем не менее, ИИ оставался повышенным даже после введения МФК в дозе  $10^{-18}$  мг/кг независимо от половой принадлежности животных.



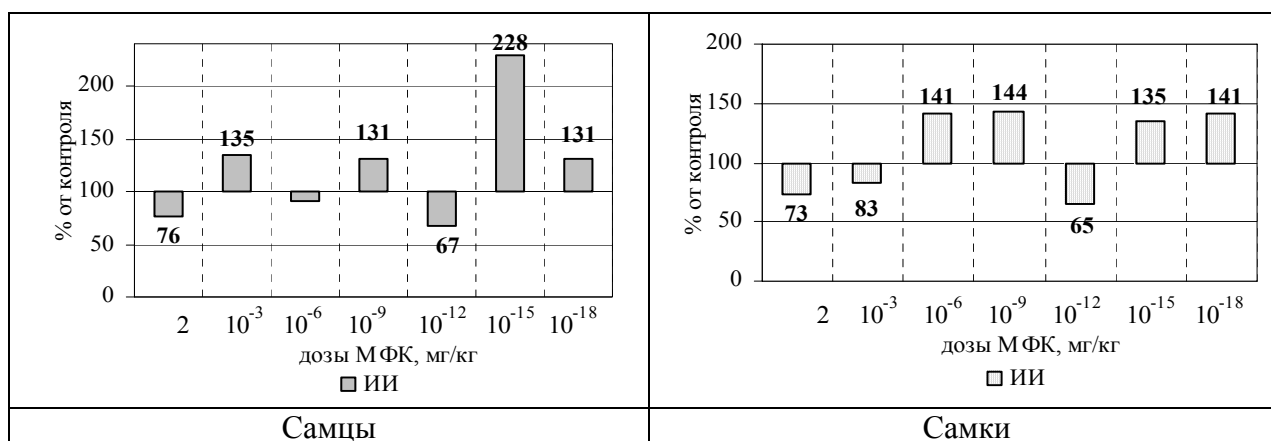


Рис. 17. Изменение интегрального индекса эндогенной интоксикации (ИИ) в крови самцов и самок после введения различных доз МФК. Примечание см. рис. 11.

У самцов после введения высоких доз МФК в тканях печени гликогенез, сопровождающийся повышением концентрации в крови лактата и пирувата (рис. 18). Для гликогена, выделенного из мышечной ткани у самцов, характерно волнообразное изменение – под действием высокой и низких доз МФК преобладал гликогонеогенез, на что указывало снижение лактата и пирувата при увеличении активности ЛДГ. Содержание креатина и КрФ было, в основном, понижено. Изменения энергетических субстратов указывают, скорее всего, на регуляторное действие МФК.

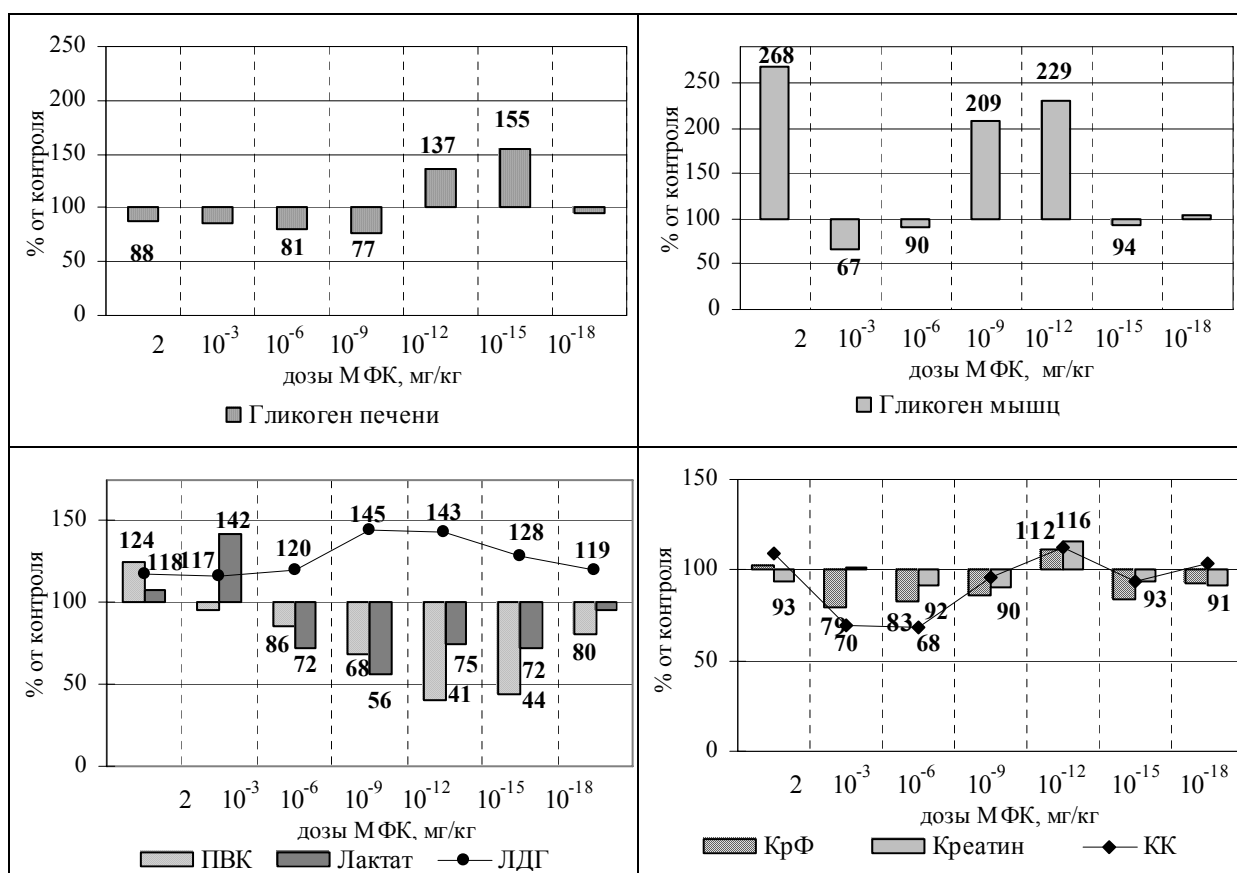


Рис. 18. Изменение содержания субстратов углеводного обмена - гликогена в печени и ПВК, лактата и активности ЛДГ, КК в сыворотке, гликогена, креатина и КрФ в мышцах у самцов опытных групп через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Влияние МФК практически во всех дозах на углеводный обмен у самок приводило к распаду гликогена в тканях, особенно в мышцах (рис. 19). Содержание пирувата при действии низких доз МФК уменьшалось в 2-3 раза, что указывает, вероятно, на перераспределение энергетических ресурсов в ответ на стресс. Содержание анаэробного макроэрга КрФ в мышцах изменялось, в основном, недостоверно и было повышено только после введения МФК в дозе  $10^{-12}$  мг/кг при неспецифическом снижении активности КК (рис. 19). Активность сывороточной ЛДГ оставалась незначительно повышенной независимо от вводимой дозы МФК, что подтверждает особую роль ЛДГ – катализировать обратимую стадию гликолиза (ПВК↔МК) и быть индикатором буферной емкости всех систем организма.

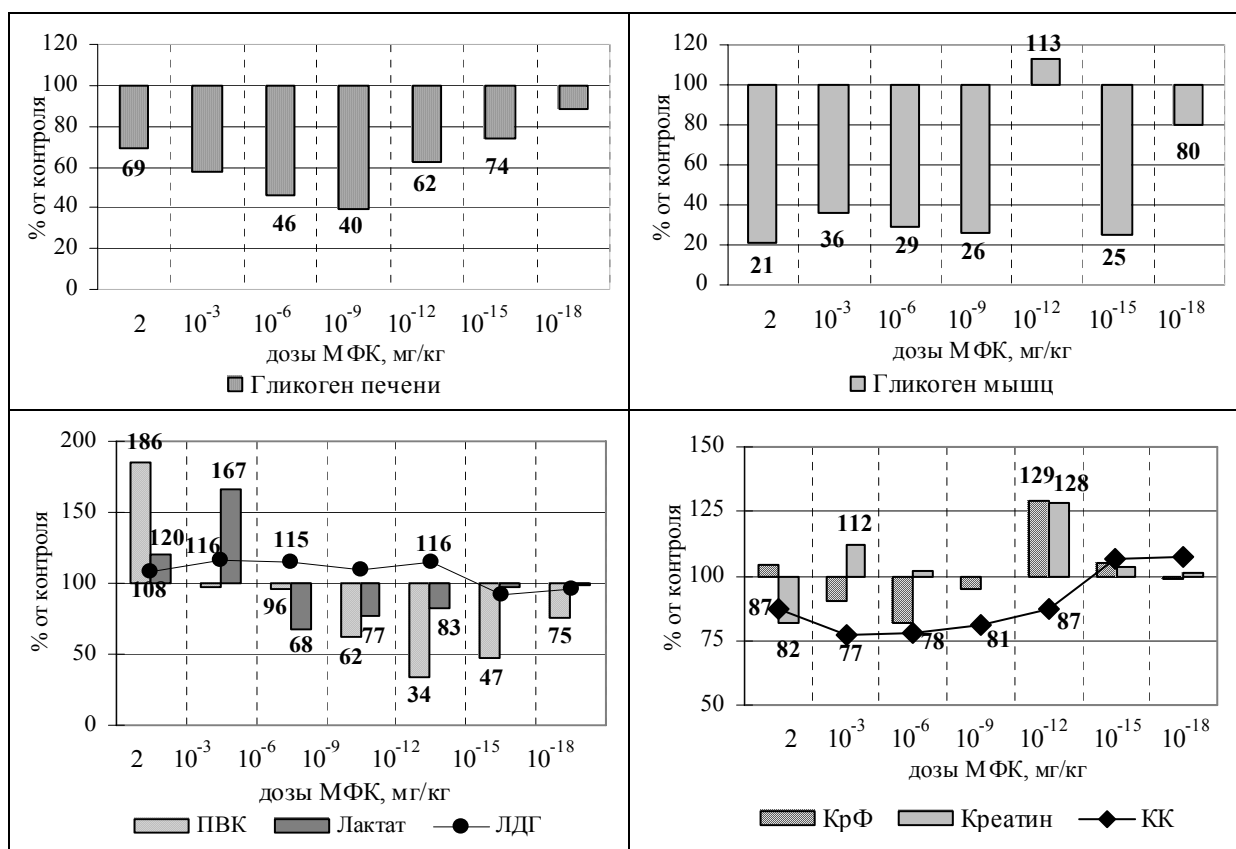


Рис. 19. Изменение содержания гликогена в печени и ПВК, лактата и активности ЛДГ, КК в сыворотке, гликогена, креатина и КрФ в мышцах у самок опытных групп через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Сравнительный анализ изменений биохимических показателей метаболизма у самцов и самок лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозах 2,  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-18}$  мг/кг показал, что однократное введение различных доз МФК вызывало достоверное изменение большинства изучаемых показателей. При этом была отмечена закономерность волнообразного характера с максимальным влиянием МФК в диапазонах высоких (2 и  $10^{-3}$  мг/кг) и низких ( $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$  и  $10^{-15}$  мг/кг) доз и минимальным влиянием на уровне  $10^{-6}$  и  $10^{-18}$  мг/кг доз МФК (рис. 20).

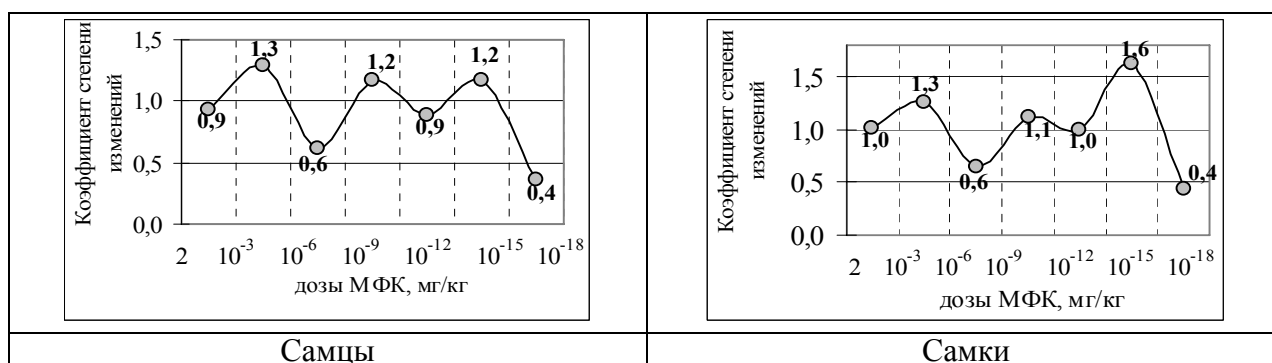


Рис. 20. Изменение коэффициента степени изменений биохимических показателей в зависимости от вводимых доз МФК самцам лабораторных мышей.

Факторный анализ биохимических показателей метаболизма мышей линии СВА через 72 часа после введения МФК в дозе  $10^{-3}$  мг/кг выявил наличие 2-х групп факторов (табл. 2). Эти факторы названы нами для самцов – фактором мембранного транспорта (ВНСММ, ОП, холестерин, общие липиды) и мышечной деградации (гликоген мышц и ВНСММ в эритроцитах) и для самок – фактором функции печени (гликоген печени и общие белки) и ПОЛ с нарушением мембранных липидов (МДА, СОД и холестерин).

Таблица 2

Факторные нагрузки биохимических показателей лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозе  $10^{-3}$  мг/кг

Самцы	1	2	Самки	1	2	3
Холестерин	0,949		Гликоген печени	-0,828		
ОП в плазме	0,873		Общий белок	0,775		
Общие липиды	0,835		МДА		0,967	
ВНСММ в плазме	0,733		СОД		0,569	
ВНСММ в эритроцитах		-0,912	Холестерин		0,555	
Гликоген мышц		-0,965	Гликоген мышц			0,904
Выделенные дисперсии, %	26	20	Выделенные дисперсии, %	22	20	16

Примечание. Факторные нагрузки признаков, значения которых в повернутой матрице факторного отображения не превышают по модулю 0,5, и выделенные дисперсии в прямой матрице не превышающие 10% не показаны.

Через 72 часа после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг у самцов и у самок показатели группировались возле одного фактора, который у самцов реализовывался нагрузками ОП и ВНСММ в эритроцитах («фактор сорбции эндотоксинов эритроцитами»), а у самок – нагрузками энергетических показателей, в основном, гликогеном мышц (табл. 3).

Таблица 3

Факторные нагрузки биохимических показателей лабораторных мышей через 72 часа после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг.

Самцы	1	Самки	1
ОП в эритроцитах	0,933	Гликоген мышц	0,806
Креатинфосфат	0,848	Триглицериды	0,576
ПВК	0,796		
ВНСММ в эритроцитах	0,720		
Гликоген мышц	-0,565		
Выделенные дисперсии, %	30	Выделенные дисперсии, %	24

Примечание см. табл. 2.

**Изменение биохимических показателей метаболизма белых лабораторных мышей под влиянием метилфосфоновой кислоты в условиях долговременного эксперимента.** Для оценки адаптационных возможностей организма и временного промежутка необходимого для нормализации показателей метаболизма у лабораторных мышей после однократного подкожного введения высоких и низких доз МФК нами был проведен долговременный эксперимент длительностью 30 суток с отбором биоматериала через 6, 12, 18 и 30 суток. Условия этого эксперимента (вводимые дозы и пол животного) зависели от результатов, полученных при изучении времени максимального достоверного отклика и дозозависимого эффекта воздействия МФК с учетом количества достоверно изменяющихся показателей и коэффициента степени их изменений.

Результаты изучения показателей углеводного обмена у самок показали, что через 6 суток достоверно изменялось содержание гликогена в мышцах (снижалось на 21% и увеличивалось на 19% после введения высокой и низкой дозы МФК соответственно), КрФ в мышцах (снижалось на 20-25%) и лактата в сыворотке (увеличивалось на 10 и 28%). Через 12 суток после введения как высокой, так и низкой дозы МФК, достоверно уменьшалось содержание КрФ в мышцах и лактата в сыворотке (рис. 21). Этот факт, видимо, указывает на особую роль гликолиза, как механизма бескислородного энергообеспечения, и универсального анаэробного макроэрга и фосфагена креатинфосфата, входящего в клетки с многообразной функциональной активностью, и, в первую очередь, в клетки скелетных мышц для обеспечения мышечной работы. К 18-м суткам все энергетические показатели не отличались от контрольных значений.

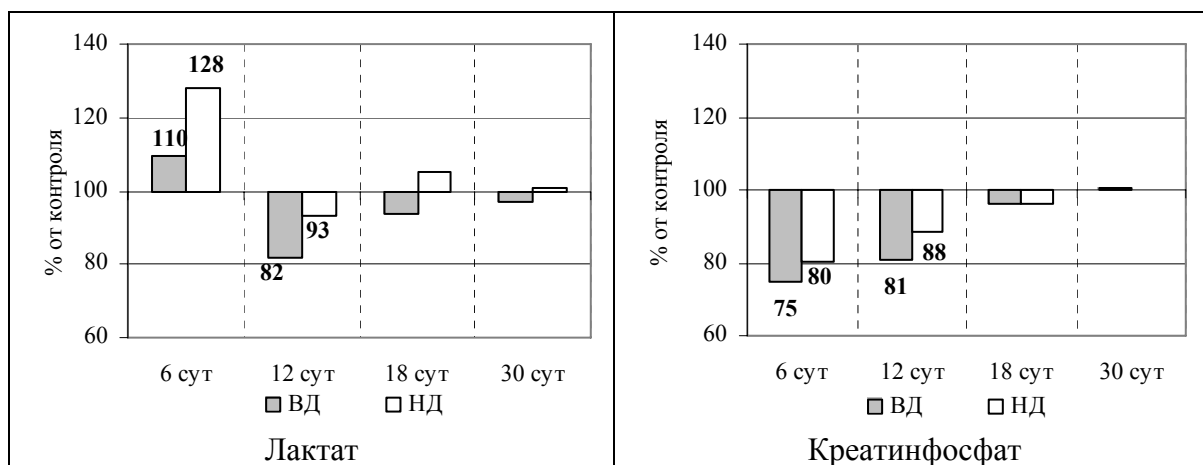


Рис. 21. Изменение содержания лактата и креатинфосфата у самок через 6, 12, 18, 30 суток после подкожного введения высокой  $10^{-3}$  (ВД) и низкой  $10^{-12}$  (НД) мг/кг доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Нормализация субстратов липидного обмена (общих липидов, холестерина и триглицеридов) у самок в ответ на введение МФК в дозе 2 мг/кг наступала к 18-м суткам эксперимента, а в дозе  $10^{-15}$  мг/кг – к 12-м суткам. Активность ферментов АОС не отличалась от контроля лишь на 30

сутки, при этом активность каталазы оставалась выше активности СОД (рис. 22).

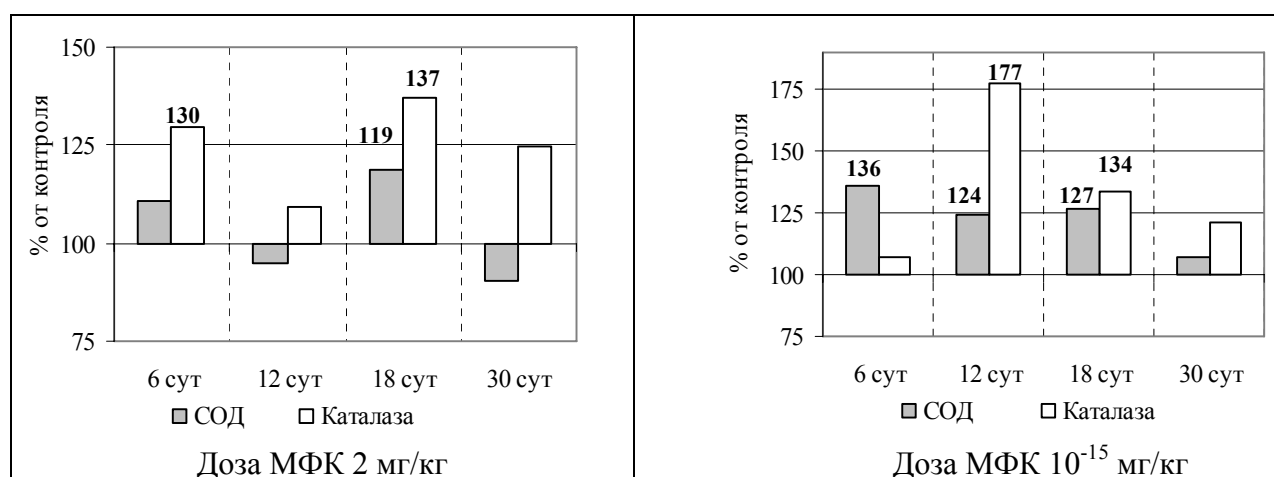


Рис. 22. Изменение активности СОД в эритроцитах и каталазы в плазме крови самок через 6, 12, 18 и 30 суток после введения самкам МФК в дозах 2 и 10<sup>-15</sup> мг/кг.

Примечание см. рис. 11.

Однако содержание МДА даже на 30-е сутки после введения как высокой, так и низкой доз МФК, оставалось на треть выше контрольных значений (рис. 23), что отразилось на функциональном показателе свободно-радикального окисления, который был ниже контроля в 1,5 раза, что говорит об истощении резервов АОС или срыве долгосрочной адаптации.

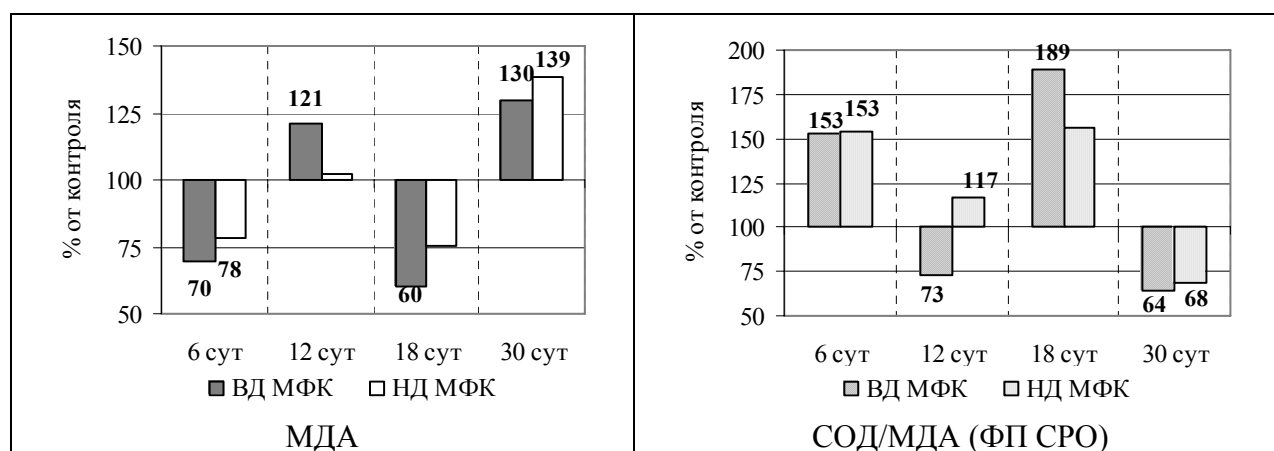


Рис. 23. Изменение содержания МДА и показателя свободно-радикального окисления (СОД/МДА) в плазме крови самок через 6, 12, 18 и 30 суток после введения высокой (ВД, 2 мг/кг) и низкой (НД, 10<sup>-15</sup> мг/кг) доз МФК. Примечание см. рис. 11.

На фоне практических нормальных значений общего белка, начиная с 12-х суток, отмечался постепенный рост как раннего маркера (АФГ), так и позднего маркера (КФГ) окислительной деструкции белков. Содержание АФГ в плазме, увеличившись на треть, достигло максимума через 30 суток после введения высоких и низких доз МФК (рис. 24). Это указывало на одинаковую интенсивность окислительной модификации белков, как через трое суток, так и через 30 суток после введения низких доз МФК,

свидетельствуя о срыве адаптивных механизмов, обеспечивающих работу АОС.

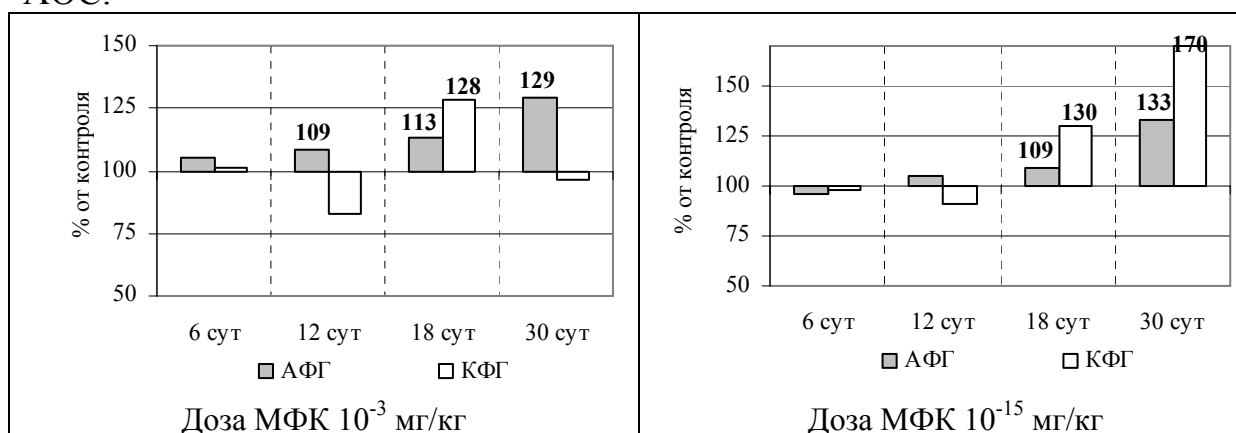


Рис. 24. Изменение содержания продуктов ПОБ в виде АФГ и КФГ через 6, 12, 18 и 30 суток после подкожного введения МФК в высокой  $10^{-3}$  и низкой  $10^{-15}$  мг/кг дозах. Примечание: см. рис. 11.

Данные об изменении содержания ОП в плазме и эритроцитах крови мышей опытных групп к 30 суткам после введения высоких и низких доз МФК позволили сделать вывод о нормализации процессов образования ОП (рис. 25).

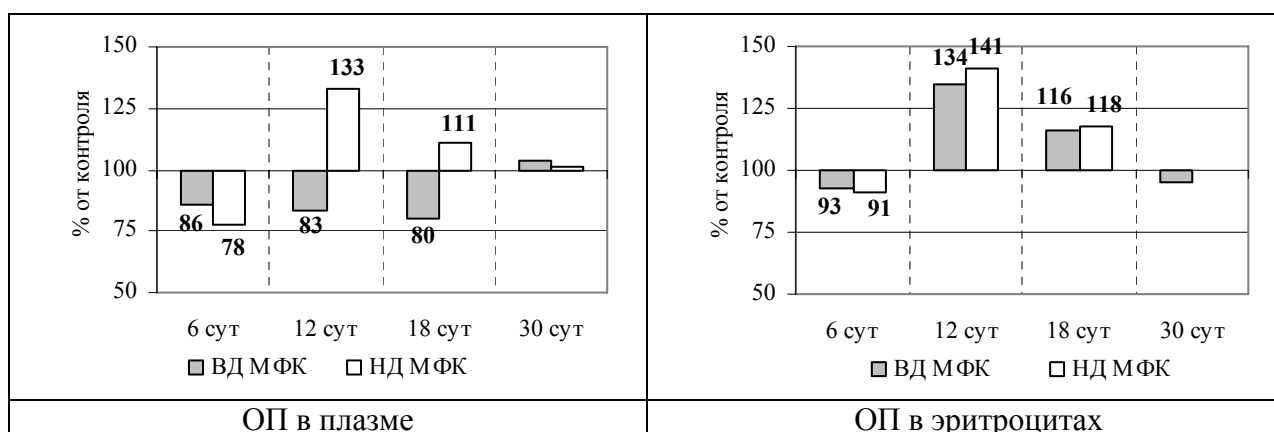


Рис. 25. Изменение содержания ОП в плазме и эритроцитах крови самцов через 6, 12, 18 и 30 суток после подкожного введения МФК в дозах  $10^{-3}$  (ВД) и  $10^{-15}$  (НД) мг/кг. Примечание см. рис. 10.

О сложном и неоднозначном протекании адаптивных процессов в организме мышей опытных групп указывали и маркеры эндогенной интоксикации – ВНСММ в плазме и эритроцитах (рис. 26). После введения МФК в дозе  $10^{-3}$  мг/кг уровень ВНСММ в плазме и эритроцитах незначительно отличался от контроля, а после введения МФК в дозе  $10^{-15}$  мг/кг изменения в содержании ВНСММ в плазме были особенно значительны (повышены в 1,36-1,84 раза) до 18-х суток. Достоверное повышение содержания ВНСММ в эритроцитах крови мышей через 30 суток после введения МФК как в высокой, так и низкой дозах при отсутствии отличий в плазме может свидетельствовать о нарушении процессов десорбции эндотоксинов эритроцитами в печени.

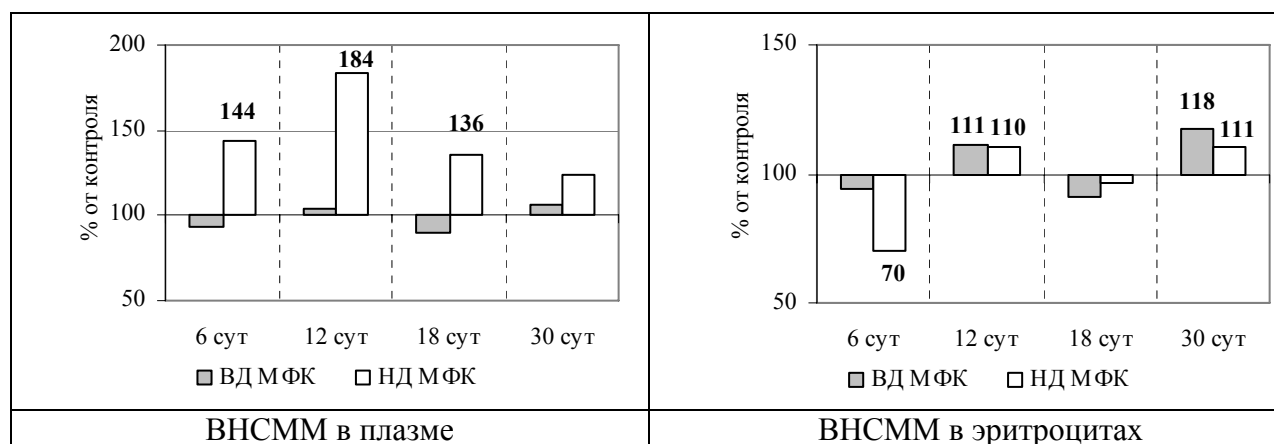


Рис. 26. Изменение содержания ВНСММ в плазме и эритроцитах крови самцов через 6, 12, 18, 30 суток после подкожного введения высокой  $10^{-3}$  (ВД) и низкой  $10^{-15}$  (НД) мг/кг доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Таким образом, разовое подкожное введение самцам лабораторных мышей такого специфического поллютанта как МФК, провоцирующего в организме состояние окислительного стресса, привело к истощению его резервно-адаптационных возможностей, что сопровождалось активацией перекисного окисления белков, содержание которых было повышено даже через 30 суток после введения МФК. Причем, глубина изменений биохимических показателей ПОБ более выражена при введении МФК в низкой дозе  $10^{-15}$  мг/кг массы животного. Воздействие в таких низких дозах имеет, видимо, регуляторный характер, приводя к срыву адаптивных механизмов.

Так как проведенные исследования показали, что МФК влияет на показатели, связанные с функциями печени, поэтому нами было изучено влияния различных доз МФК на активность важнейших ферментов – маркеров состояния печени – холинэстеразы, аспартат- и аланинаминотрансфераз. При этом было выявлено, что МФК во всех дозах, в том числе очень низкой ( $10^{-18}$  мг/кг), влияла на активность этих ферментов (рис. 27). Наблюдался волнообразный характер изменений с минимальными значениями для большинства показателей после введения МФК в средних дозах  $10^{-6}$  и  $10^{-9}$  мг/кг массы животного. Активность АЛТ оставалась во всех вариантах опытов ниже значений в контроле, уменьшаясь примерно одинаково (на 27-45%) после введения как высоких, так и низких доз МФК. Понижение активности АЛТ, вероятно, может быть вызвано дефицитом его кофермента – пиридоксальфосфата за счет переэтерификации с МФК, а также при состояниях, связанных с повреждением гепатоцитов, способных синтезировать АЛТ.

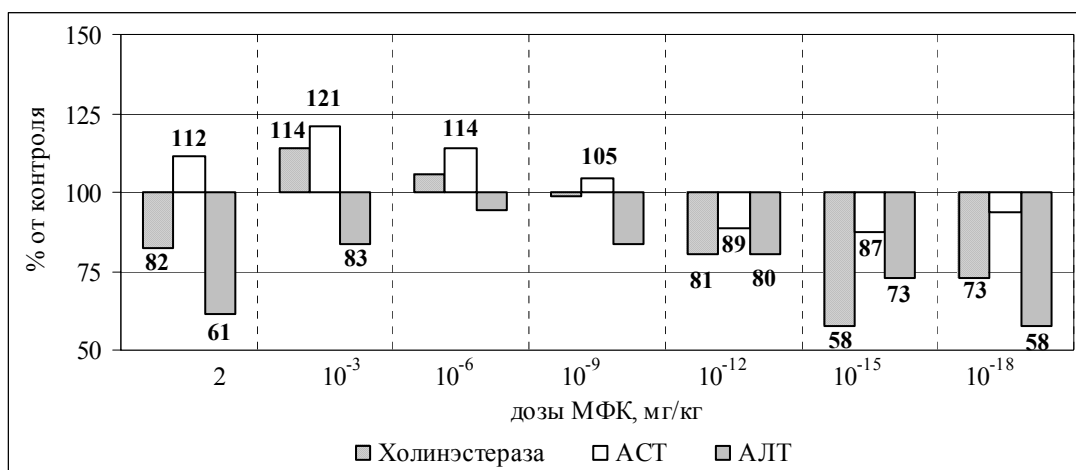


Рис. 27. Изменение активности холинэстеразы, АСТ, АЛТ в плазме крови самцов через 72 часа после введения различных доз МФК. Примечания см. рис. 11.

Активность холинэстеразы снижалась после введения высоких и низких доз МФК, максимально в 1,7 раза после введения дозы  $10^{-15}$  мг/кг (рис. 27). Снижение активности холинэстеразы в сыворотке крови характерно при отравлениях фосфорорганическими инсектицидами, которые необратимо ингибируют активный центр этого фермента. Можно предположить, что МФК в активном центре холинэстеразы взаимодействует с гидроксильной группой серина, приводя к обратимому ингибированию.

**Изменение биохимических показателей метаболизма белых лабораторных мышей под влиянием метилфосфоновой кислоты в условиях хронического эксперимента.** Для доз МФК  $10^{-3}$  и  $10^{-15}$  мг/кг, которые вызвали наибольшее число достоверных и максимальных изменений в изучаемых показателях, был выполнен хронический эксперимент. Для определения возможных различий в реакции организма животного на способ введения токсиканта применяли подкожное и пероральное введение МФК.

Еженедельное введение в течение 12 недель самцам подкожно высокой дозы МФК приводило к повышению активности только АЛТ, а в низкой дозе – к увеличению активности АСТ и особенно ХЭ, что может быть связано с необходимостью синтеза белков (прежде всего альбумина), из-за их повышенного распада по пути окислительной модификации. Пероральное введение самцам высокой и низкой доз МФК не вызывало достоверных изменений в активности изученных ферментов (рис. 28).

У самок подкожное введение МФК приводило снижение активности АЛТ в 1,5 раза, а пероральное – для низкой дозы МФК к повышению активности АСТ (рис. 28).

Эти данные позволили нам утверждать, что самцы более подвержены влиянию МФК, особенно в низкой дозе, которое направлено, в основном, на белковые молекулы, что сопровождается повышением активности ХЭ для восполнения модифицированных белков. Пероральное введение МФК по сравнению с подкожным введением существенно меньше влияет на организм



животных, что связано с особенностями процесса трансмембранного переноса МФК в желудочно-кишечном тракте.

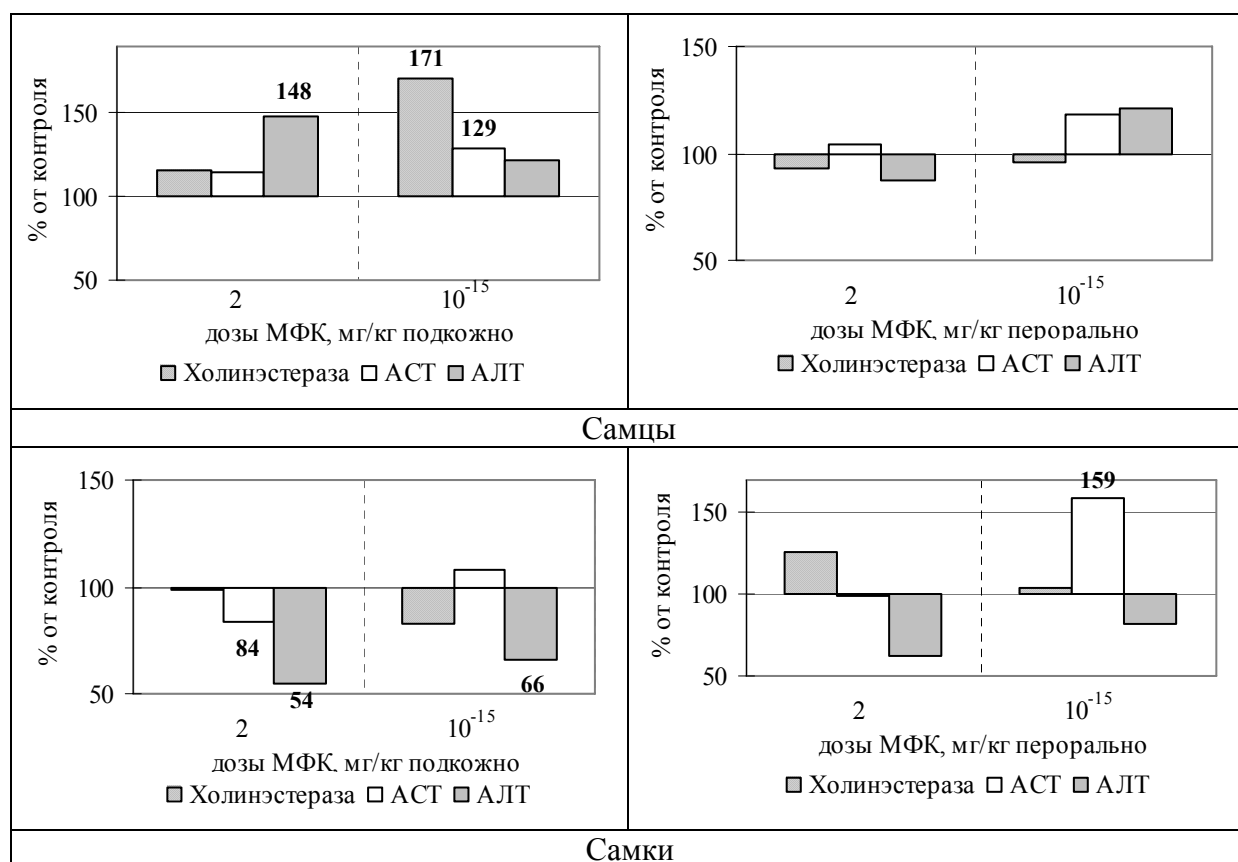


Рис. 28. Изменение активности холинэстеразы и аминотрансфераз АСТ, АЛТ в плазме крови самцов и самок через 12 недель после еженедельного подкожного и перорального введения высокой (2 мг/кг) и низкой ( $10^{-15}$  мг/кг) доз МФК. Примечание см. рис. 11.

Результаты факторного анализа изменений биохимических показателей белых лабораторных мышей в процентах от значений в контрольных группах выявили особенности реакции организма самцов и самок в ответ на введение различных доз МФК (табл. 4).

Факторные нагрузки у самцов и самок группировались возле 3-х факторов и, в общем, были представлены показателями работы АОС (активность СОД, продукты ПОБ и ПОЛ), продуктами катаболизма биомолекул (ОП, ВНСММ) и показателями анаэробного энергообеспечения (гликоген в печени и мышцах, КрФ, лактат, ПВК, ЛДГ, КК). Первый фактор у самцов объединил показатели гликолиза (лактат, ПВК, ЛДГ) и окислительной модификации белков (АФГ и КФГ) – фактор «анаэробного энергообеспечения» и «системы ПОБ-АОС»; у самок – холестерин, МДА, СОД – фактор «системы ПОЛ-АОС», которые, в том числе, входят в клеточные плазматические мембраны. Второй и третий факторы у самцов были нами определены как «катаболизм белков и сорбция эндотоксинов эритроцитами», «энергообеспечение мышц» и «система ПОЛ-АОС», а у самок – фактор гликолиза, «система ПОБ-АОС» и «сорбция эндотоксинов эритроцитами».

Таблица 4

Факторные нагрузки изменений биохимических показателей лабораторных мышей через 72 часа после введения различных доз МФК

Самцы	1	2	3	Самки	1	2	3
Лактат	0,951			Холестерин	0,891		
КФГ	-0,870			МДА	0,840		
ПВК	0,709			СОД	-0,825		
ЛДГ	-0,592			КК		-0,953	
АФГ	-0,508			ЛДГ		0,939	
ОП эритроцитов		-0,971		Гликоген печени		-0,861	
Гликоген мышц		0,957		ВНСММ в плазме		-0,730	
КК		0,876		АФГ		-0,567	
Креатинфосфат		0,815		Креатинфосфат			0,883
ОП в плазме		-0,514		ОП в эритроцитах			-0,868
МДА			-0,771				
Выделенные дисперсии, %	30	26	22	Выделенные дисперсии, %	30	23	19

Примечание см. табл. 2.

Анализ полученных результатов в целом показал, что в качестве биохимических показателей при оценке воздействия на теплокровные организмы метилфосфонатов в высоких и низких дозах могут быть использованы:

маркеры работы АОС - продукты ПОБ в виде АФГ и КФГ, продукты ПОЛ в виде МДА в плазме, активность эритроцитарной СОД и интегральные индексы свободно-радикального окисления СОД/ПОБ и СОД/МДА;

маркеры эндогенной интоксикации – ВНСММ и ОП в плазме и эритроцитах и интегральный индекс интоксикации;

энергетические маркеры - тканевый гликоген, пируват и лактат в сыворотке;

активность ферментов-маркеров состояния печени – холинэстеразы, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы.

## ВЫВОДЫ

1. Метилфосфоновая кислота (МФК) обладает выраженным дозозависимым действием с максимальным влиянием на показатели метаболизма животных в диапазонах высоких (2 и  $10^{-3}$  мг/кг) и низких ( $10^{-12}$  и  $10^{-15}$  мг/кг) доз и минимальным – на уровне средних и очень низких ( $10^{-6}$  и  $10^{-18}$  мг/кг) доз.

2. У мышей линии СВА ответ на введение МФК зависит от половой принадлежности животных. Наибольшие изменения метаболизма в остром периоде эксперимента после однократного введения МФК в дозе 2 мг/кг происходят у самцов через 12ч, у самок через 24ч. Действие низких доз МФК

вызывает у самцов по сравнению с самками большие изменения в белковом обмене и работе антиоксидантной системы.

3. У самцов через 12ч после введения МФК в дозе 2 мг/кг наблюдаются типичные для острого стресса изменения белкового обмена: гиперпродукция  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов на 20-40% при уменьшении на треть  $\gamma$ -глобулиновой фракции; рост маркеров окислительного распада белков до кетопроизводных в 2 раза при снижении активности СОД; увеличение содержания олигопептидов в плазме и эритроцитах в 1,2 и 2 раза (соответственно) и ВНСММ в плазме в 1,4 раза за счет катаболической составляющей. Эти процессы сопровождается уменьшением уровня гликогена в печени и мышцах. У самок наблюдается дисглобулинемия, выражающаяся в увеличении  $\gamma$ -глобулинов на 30% и уменьшении  $\alpha$ 1- и  $\beta$ -глобулинов, сопровождающаяся снижением продуктов ПОБ и активности СОД.

Через 24 ч у самцов происходит восстановление основных показателей метаболизма при снижении продуктов окислительного распада и увеличении активности СОД в 1,7 раза. У самок наблюдается повышение альбуминов и острофазовых белков при снижении в 1,5 раза уровня  $\gamma$ -глобулинов, сопровождающееся ростом маркеров перекисного окисления белков в плазме и олигопептидов в эритроцитах.

4. Особенностью изменений показателей метаболизма у самцов и самок после введения *высоких доз* МФК (через 72 ч) является достоверное понижение на треть продуктов перекисного окисления белков и липидов при повышении активности эритроцитарной СОД; снижение уровня гликогена в печени (в среднем на 20%) при повышении содержания пирувата в сыворотке на 20-80%. Для самцов характерно увеличение, а для самок снижение в 2,7 и в 4,8 раза (соответственно) мышечного гликогена. В этот период у самцов происходит снижение активности ферментов холинэстеразы и АЛТ (на 20-40%), характеризующих функцию печени.

5. Особенностью изменений показателей метаболизма у самцов после введения *низких доз* МФК (через 72 ч) является достоверное снижение уровня продуктов ПОЛ и рост продуктов ПОБ в 1,4-1,8 раза при повышении активности СОД (в 1,5 раза); увеличение содержания средних молекул в плазме и эритроцитах, сопровождающееся повышением индекса интоксикации (в 2,3 раза). У самок активность СОД и уровень продуктов ПОБ остаются в пределах значений контрольных групп при снижении уровня продуктов ПОЛ на треть; содержание средних молекул увеличивалось в 1,4 раза только в эритроцитах, оставаясь в пределах нормы в плазме.

6. В долговременном эксперименте (через 18 суток) после однократного введения высоких и низких доз МФК для большинства отмечается нормализация, либо тенденция к нормализации показателей метаболизма: увеличение активности СОД и каталазы сопровождается снижением продуктов перекисного окисления, особенно липидов. Через 30

суток на фоне нормальных значений происходит активация перекисного окисления – рост уровня МДА на 30-40%, альдегидопроизводных молекул – 30-35%. Увеличение кетопроизводных молекул на 70% отмечено только после введения МФК в низкой дозе.

7. Поступление высоких и низких доз МФК (в виде подкожных инъекций) в течение 12 недель вызывает достоверное повышение активности ферментов- АСТ, АЛТ и холинэстеразы. У самок происходит снижение активности этих ферментов, максимально для АЛТ в 1,5 раза. Хроническое пероральное введение различных доз МФК не приводит к значимым изменениям в активности холинэстеразы и аминотрансфераз у самцов; у самок введение МФК в низкой дозе вызывает повышение активность АСТ в 1,6 раза.

8. В качестве биохимических показателей воздействия на теплокровные организмы метилфосфонатов (высоких и низких дозах), предлагается использовать:

- маркеры работы АОС – продукты ПОБ и ПОЛ в плазме;
- активность эритроцитарной СОД;
- интегральные индексы свободно-радикального окисления -СОД/ПОБ и СОД/МДА;
- маркеры эндогенной интоксикации – ВНСММ и ОП в плазме и эритроцитах;
- интегральный индекс интоксикации;
- энергетические маркеры – тканевый гликоген, пируват и лактат в сыворотке;
- активность ферментов-маркеров состояния печени – холинэстеразы, аланин- и аспартатаминотрансферазы.

### **Основные работы, опубликованные по теме диссертации**

**Работы, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ:**

1. **Плотникова, О.М.** Особенности влияния различных доз метилфосфоновой кислоты на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей / О.М. Плотникова, И.В. Савинова, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин, А.Н. Евдокимов, С.Н. Лунева // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. - 2011. -№ 1. -С. 307-316.

2. **Плотникова, О.М.** Оценка влияния низких доз метилфосфоната на теплокровных животных по биохимическим показателям крови мышей / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова, А.М. Корепин, С.Н. Лунева // Естественные и технические науки. - 2011. -№ 1 (51). -С. 32-37.

3. **Плотникова, О.М.** Маркеры эндогенной интоксикации в крови лабораторных мышей при интоксикации различными дозами

метилфосфоната / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, С.Н. Лунева // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. -2011. -№ 2. -С. 346-353.

4. Савинова И.В. Изучение некоторых показателей углеводного обмена лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / И.В. Савинова, **О.М. Плотникова**, С.Н. Лунева // Естественные и технические науки. - 2011. -№ 1 (51). -С. 38-41.

5. **Плотникова, О.М.** Оценка токсикологического воздействия метилфосфоната на показатели метаболизма лабораторных мышей / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, И.В. Савинова, Н.Н. Матвеев, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии. - 2011. -№ 3. -С. 138-142.

6. **Плотникова, О.М.** Экотоксикологический мониторинг состояния мелких грызунов в районе расположения объекта уничтожения химического оружия в Щучанском районе курганской области / О.М. Плотникова, М.А. Григорович, А.Н. Евдокимов, Б.И. Кудрин // Проблемы региональной экологии. - 2011.-№ 2.- С. 75-78.

7. **Плотникова, О.М.** Активность печеночных ферментов после введения метилфосфоновой кислоты самцам лабораторных мышей / О.М. Плотникова, А.Н. Евдокимов, М.А. Григорович // Вестник Челябинского государственного педагогического университета. -2011. -№ 7. -С. 231-327.

8. **Плотникова, О.М.** Биохимические показатели крови в оценке влияния метилфосфоната на лабораторных мышей в долговременном эксперименте / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, С.Н. Лунева // Теоретическая и прикладная экология. -2011. -№ 3. -С. 65-70.

9. **Плотникова, О.М.** Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом / **О.М. Плотникова**, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин, И.В. Дуплякина // Теоретическая и прикладная экология.- 2010.- № 1. -С. 81-86.

10. Чупис, В.Н. Оценка уровня генотоксичности в экологическом мониторинге / В.Н. Чупис, Н.В. Емельянова, Е.А. Танайлова, Н.В. Полухина, Т.А. Шингаренко, **О.М. Плотникова** // Теоретическая и прикладная экология. -2010. -№ 1. С. 77-80.

11. **Плотникова, О.М.** Свободнорадикальное окисления белков и липидов и энергетический обмен у лабораторных мышей при воздействии метилфосфонатов как специфических поллютантов / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Дуплякина, С.Н. Лунева // Бюллетень Московского общества испытателей природы. - 2009. -Т. 114, Вып. 3 (Ч. 3). - С. 162-165.

12. **Плотникова, О.М.** Оценка экотоксичности специфических загрязняющих веществ по изменению биохимических показателей живых организмов / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, И.В. Дуплякина, Н.Н. Матвеев // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 4. С. 42-47.

**Монографии:**

13. **Плотникова, О.М.** Биологическая активность алкилфосфонатов: влияние метилфосфоновой кислоты на гомеостаз, методы исследования: Монография / О.М. Плотникова, С.Н. Лунева, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова.- Курган: Изд-во Курганского гос. ун-та, 2011. - 120 с.

**Публикации в сборниках материалов конференций, научных и научно-практических журналах и изданиях:**

14. **Плотникова, О.М.** Влияние различных доз метилфосфоновой кислоты на показатели перекисного окисления липидов и белков у лабораторных мышей / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: Сб. статей II Международной научно-практ. конф. - СПб, 2011. -Т. 3. -С. 224-226.

15. **Плотникова, О.М.** Влияние метилфосфоната в высоких и малых дозах на основные биохимические показатели метаболизма лабораторных мышей / О.М. Плотникова, С.Н. Лунева, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова, А.Н. Евдокимов // Вестник Курганского университета. Серия «Естественные науки». - 2010. -Вып. 3. -С. 81-85.

16. Лунева, С.Н. Перекисное окисление белков и содержание маркеров эндогенной интоксикации при введении метилфосфоновой кислоты лабораторным мышам / С.Н. Лунева, **О.М. Плотникова**, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова // Мат-лы научно-практ. конф., посв. 200-летию со дня рожд. Н.И. Пирогова. -Курган, 2010. -С. 254-256.

17. Евдокимов, А. Н. Биохимические показатели полевки обыкновенной (*Microtus arvalis* Pall.) в санитарно-защитной зоне объекта уничтожения химического оружия в курганской области / А.Н. Евдокимов, **О.М. Плотникова**, М.А. Григорович, Б.И. Кудрин // Фундаментальные науки и практика: Сб. научных. трудов. -Томск.-2010. -Т. 1, № 3. -С. 42-43.

18. **Плотникова, О.М.** Изучение показателей перекисного окисления липидов в крови лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев // Экологические проблемы промышленных городов: сб. научных трудов. / Саратов, 2009. -Ч. 2. -С. 196-197.

19. **Плотникова, О.М.** Изучение показателей системы лактат-пируват-активность лактатдегидрогеназы у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / О.М. Плотникова, И.В. Дуплякина // Экологические проблемы промышленных городов: сб. научных трудов. / Саратов, 2009.- Ч.2. -С. 198-199.

20. **Плотникова, О.М.** Изучение показателей активности перекисного окисления липидов при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. -Киров.-2007. -Ч. 1. -С. 285-287.

21. **Плотникова, О.М.** Использование биохимических показателей живых организмов для оценки загрязнения природной среды зоны защитных мероприятий объекта уничтожения химического оружия / О.М. Плотникова //

Региональные проблемы природопользования и охраны окружающей среды: Мат-лы региональной научно-практ. конф. -Курган, 2008. -С. 198-203.

22. **Плотникова, О.М.** Изучение показателей энергетического обмена лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова, И.В. Дуплякина // Региональные проблемы природопользования и охраны окружающей среды: мат-лы региональной научно-практ. конф. - Курган, 2008. -С. 213-216.

23. **Плотникова, О.М.** Влияние метилфосфоновой кислоты на биометрические показатели овса *Avena sativa* L. / О.М. Плотникова, А.П. Ларионова, Э.В. Гладкова // VI Зыряновские чтения: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. -Курган, 2008. -С. 170-171.

24. Дуплякина, И.В. Содержание гликогена в печени и мышцах при интоксикации организма мышей линии СВА метилфосфоновой кислотой. / И.В. Дуплякина, **О.М. Плотникова**, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. -Киров, 2009. -Ч. 2. -С. 55-57.

25. Корепин, А.М. Изучение содержания общего белка и олигопептидов у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / А.М. Корепин, **О.М. Плотникова**, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. -Киров, 2009. -Ч. 2.- С. 58-60.

26. Матвеев, Н.Н. Влияние малых концентраций метилфосфоновой кислоты на содержание триглицеридов в плазме крови лабораторных мышей / Н.Н. Матвеев, **О.М. Плотникова**, С.Н. Лунева // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. - Киров, 2009. -Ч. 2. -С. 61-62.

27. Евдокимов, А.Н. Изменение активности некоторых ферментов печени у мышей линии СВА при действии метилфосфонатов / А.Н. Евдокимов, **О.М. Плотникова** // Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф.- Киров, 2009. Ч. 2. С. 63-65.

28. **Плотникова, О.М.** Биохимические показатели в оценке качества окружающей среды / О.М. Плотникова, Н.Н. Матвеев // Химия и общество. Грани взаимодействия: вчера, сегодня, завтра: мат-лы Юбилейной научной конф., посв. 80-летию химфака МГУ. -Москва, 2009. -С. 102.

29. **Plotnikova, O.M.** Small rodents as bioindicators for the buffer zone at the objects of storage and destruction of chemical weapons / O.M. Plotnikova, I.V. Dupliakina, A.M. Korepin, N.N. Matveev, B.I. Kudrin, A.N. Evdokimov // BIOINDICATORS 17 (17<sup>th</sup> International Conference on Environmental Bioindicators: Book of Abstract). //Moscow: MSU, 2009. -P. 81.

30. Shpanov, N.Y. Availability of *Microtus arvalis* Pall. as bioindicator of pollution in terrestrial ecosystems in the process of chemical weapons distraction / N.Y. Shpanov , **O.M. Plotnikova**, N.V. Plotnikov // BIOINDICATORS 17 (17<sup>th</sup>

International Conf. on Environmental Bioindicators: Book of Abstract).// Moscow: MSU, 2009. -Р. 88.

31. **Плотникова, О.М.** Изменение активности холинэстеразы у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова, А.Н. Евдокимов // Состояние окружающей среды и здоровье населения: мат-лы II Всероссийской научно-практ. конф. - Курган, 2009. -С. 43-44.

32. **Плотникова, О.М.** Изучение содержания общего белка и альбуминов у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфоновой кислотой / О.М. Плотникова, А.М. Корепин // Состояние окружающей среды и здоровье населения: Мат-лы II Всероссийской научно-практ. конф. -Курган, 2009.- С. 45-47.

33. Чупис, В.Н. Комплексная оценка экологического состояния территорий бывшего хранения и прошлого уничтожения химического оружия / В.Н. Чупис, С.В. Миллер, И.В. Кондаков, Н.В. Полухина, Н.В. Емельянова, Е.А. Танайлова, Т.А. Шингаренко, **О.М. Плотникова** // Научно-технические аспекты обеспечения безопасности при уничтожении, хранении и транспортировке химического оружия: Сб. тезисов V научно-практ. конф. - Москва, 2010. -С. 132-134.

34. Полухина, Н.В. Оценка экологического состояния на территории объекта хранения и уничтожения химического оружия / Н.В. Емельянова, Е.А. Танайлова, Т.А. Шингаренко, **О.М. Плотникова** / Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях: сб. трудов Всероссийской научно-практ. конф. //СПб, 2010. -С. 310-311.

35. Дуплякина, И.В. Влияние интоксикации метилфосфонатом на энергетический обмен в организме мелких теплокровных животных / И.В. Дуплякина, А.А. Абзаева, **О.М. Плотникова** //Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы: мат-лы региональной научно-практ. конф. -Улан-Удэ, 2010. -С. 87-88.

36. Евдокимов, А.Н. Использование биохимических показателей мелких грызунов в оценке качества природных экосистем в зонах защитных мероприятий опасных химических производств / А.Н. Евдокимов, А.И. Арефьев, С.А. Мельников, **О.М. Плотникова** // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы: мат-лы региональной научно-практ. конф. -Улан-Удэ, 2010. -С. 88-90.

37. Корепин, А.М. Динамика содержания маркеров эндогенной интоксикации в крови при воздействии метилфосфонатов на лабораторных мышей / А.М. Корепин, **О.М. Плотникова** // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы: Мат-лы региональной научно-практ. конф. -Улан-Удэ, 2010. -С. 91-93.

38. Матвеев, Н.Н. Влияние интоксикации метилфосфонатом на базовые показатели липидного обмена /Н.Н. Матвеев, **О.М. Плотникова** // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы: мат-лы региональной научно-практ. конф. -Улан-Удэ, 2010. -С. 99-101.



39. Григорович, М.А. Биохимические и морфологические показатели крови мелких грызунов в санитарно-защитной зоне объекта уничтожения химического оружия в Щучанском районе / М.А. Григорович, **О.М. Плотникова**, А.Н. Евдокимов, Б.И. Кудрин // Экология. Риск. Безопасность: мат-лы междунар. научно-практ. конф. -Курган, 2010.- Т. 2. -С. 130-131.
40. **Плотникова, О.М.** Активность некоторых ферментов печени при воздействии на лабораторных мышей специфических загрязняющих веществ / О.М. Плотникова, А.Н. Евдокимов, Е.Н. - Курган, 2010. -Т. 2. -С. 153.
41. Кудрин, Б.И. Морфологические и биохимические показатели крови коров зоны защитных мероприятий объекта уничтожения химического оружия в Щучанском районе / Б.И. Кудрин, С.В. Зюзин, **О.М. Плотникова**, А.Н. Евдокимов, М.А. Григорович // Экология. Риск. Безопасность: мат-лы междунар. научно-практ. конф. -Курган, 2010. -Т. 2. -С. 140-141.
42. Корепин, А.М. Влияние различных концентраций метилфосфоновой кислоты на содержание основных маркеров развития эндогенной интоксикации у самцов белых лабораторных мышей / А.М. Корепин, С.Н. Лунева, **О.М. Плотникова** // Экология. Риск. Безопасность: Мат-лы междунар. научно-практ. конф. -Курган, 2010. -Т. 2. -С. 138-139.
43. Корепин, А.М. Влияние метилфосфоната на белковый обмен лабораторных мышей на примере адаптации к разовому введению различных доз / А.М. Корепин, **О.М. Плотникова** // Биология будущего: традиции и инновации: мат-лы Всерос. науч. конф. с междунар. участием. - Екатеринбург, 2010. -С. 138-139.
44. Савинова, И.В. Изменение некоторых показателей углеводного обмена лабораторных мышей в ответ на введение метилфосфоната /И.В. Савинова, **О.М. Плотникова** // Биология будущего: традиции и инновации: Мат-лы Всероссийской научной конф. с междунар. участием. -Екатеринбург, 2010. -С. 141-142.
45. Матвеев, Н.Н. Влияние введения метилфосфоновой кислоты в дозах 2 и  $1 \times 10^{-15}$  мг/кг на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему лабораторных мышей / Н.Н. Матвеев, **О.М. Плотникова** // Биология будущего: традиции и инновации: мат-лы Всероссийской научной конф. с междунар. участием. -Екатеринбург, 2010. - С. 137-138.
46. **Плотникова, О.М.** О возможности использования показателей крови лабораторных мышей для оценки степени токсичности почвогрунтов / О.М. Плотникова, М.А. Григорович, Б.И. Кудрин // Антропогенная трансформация природной среды: мат-лы междунар. конф. -Пермь, 2010. -Т. 1, Ч. 2. -С. 127-132.
47. **Плотникова, О.М.** К вопросу возможного влияния на мелких грызунов метилфосфонатов – особой группы веществ антропогенной природы / О.М. Плотникова, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев, И.В. Дуплякина // Антропогенная трансформация природной среды: мат-лы междунар. конф. - Пермь, 2010. -Т.1, Ч. 2.- С. 133-140.

48. Корепин, А.М. Динамика содержания общего белка и олигопептидов у лабораторных мышей при интоксикации метилфосфонатом / А.М. Корепин, **О.М. Плотникова**, С.Н. Лунева // Мат-лы XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. -Москва-Калуга, 2010. -С. 295.

49. Лунева, С.Н. Изучение содержания гликогена лабораторных мышей при введении метилфосфоновой кислоты / С.Н. Лунева, **О.М. Плотникова**, И.В. Савинова, Н.Н. Матвеев, А.М. Корепин // Мат-лы научно-практ. конф., посв. 200-летию со дня рожд. Н.И. Пирогова. -Курган, 2010. -С. 253-254.

50. Лунева, С.Н. Влияние интоксикации метилфосфонатом на основные биохимические показатели метаболизма у лабораторных мышей / С.Н. Лунева, **О.М. Плотникова**, А.М. Корепин, Н.Н. Матвеев // Мат-лы научно-практ. конф., посв. 200-летию со дня рожд. Н.И. Пирогова. -Курган, 2010.- С. 256-257.

51. **Плотникова, О.М.** Использование показателей функционального состояния организма лабораторных мышей для оценки степени токсичности экстрактов почв и грунтов / О.М. Плотникова, М.А. Григорович, Б.И. Кудрин, А.Н. Евдокимов // Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации: Сб. матер. VIII Всерос. научно-практ. конф. -Киров: ООО «Лобань», 2010. -Ч. 10. -С. 199-202.

52. Григорович, М.А. Морфологические и биохимические показатели крови полевки обыкновенной в ЗЗМ объекта по уничтожению химического оружия в г. Щучье Курганской области / М.А. Григорович, Б.И. Кудрин, А.Н. Евдокимов, **О.М. Плотникова** // Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации: Сб. VIII Всерос. научно-практ. конф. -Киров: ООО «Лобань», 2010. -Ч. 1. -С. 18-20.

53. Савинова, И.В. Влияние подкожного введения метилфосфоновой кислоты на некоторые показатели углеводного обмена лабораторных мышей линии СВА / И.В. Савинова, **О.М. Плотникова**, С.Н. Лунева // Современные проблемы биомониторинга и биоиндикации: Сб. матер. VIII Всероссийской научно-практ. конф. -Киров: ООО «Лобань», 2010. -Ч. 1. -С. 196-198.

54. Григорович, М.А. Влияние токсичных почвогрунтов на морфологические показатели внутренних органов / М.А. Григорович, **О.М. Плотникова**, Б.И. Кудрин // Состояние окружающей среды и здоровье населения: Мат-лы III Международной научно-практ. конф. -Курган, 2011. - С. 39-44.

55. Григорович, М.А. Влияние метилфосфоновой кислоты на содержание иммуноглобулина-Г в плазме крови белых мышей / М.А. Григорович, Б.И. Кудрин, **О.М. Плотникова**, М.Ю. Голубицкая // Состояние окружающей среды и здоровье населения: Мат-лы III Международной научно-практ. конф. -Курган, 2011. -С. 98.

56. Матвеев, Н.Н. Показатели обмена липидов мелких грызунов при интоксикации метилфосфоновой кислотой в различных дозах / Н.Н. Матвеев, **О.М. Плотникова** // Состояние окружающей среды и здоровье населения: Мат-лы III Международной научно-практ. конф. -Курган, 2011. -С. 110-112.

57. **Плотникова, О.М.** Активность холинэстеразы плазмы крови у мелких грызунов при интоксикации моноэтаноламином / О.М. Плотникова, А.Н. Евдокимов, А.И. Арефьев // Состояние окружающей среды и здоровье населения: Мат-лы III Международной научно-практ. конф.- Курган, 2011. - С. 113-114.

58. Матвеев Н.Н. Биохимические показатели у мышей через сутки после интоксикации метилфосфоновой кислотой / Н.Н. Матвеев, И.В. Савинова, А.М. Корепин, **О.М. Плотникова** // Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы: Мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. с междунар. участ. -Улан-Удэ, 2011. -С. 188-189.

59. Григорович, М.А. Показатели крови мышевидных грызунов в зоне защитных мероприятий объекта уничтожения химического оружия в Курганской области в 2008-2010 г.г. / М.А. Григорович, Б.И. Кудрин, **О.М. Плотникова** // IX Зыряновские чтения: Мат-лы научно-практ. конф.- Курган, 2011. -С. 175-176.

60. Евдокимов, А.Н. Изменение активности ферментов печени при влиянии специфических токсикантов уничтожения химического оружия фосфорорганических отравляющих веществ / А.Н. Евдокимов, **О.М. Плотникова**, М.А. Григорович // Биологический мониторинг природно-техногенных систем: Мат-лы Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участ. Киров, 2011. -С. 170-172.

61. **Плотникова О.М.** Активность некоторых ферментов в ответ на введение метилфосфоната лабораторным мышам /О.М. Плотникова, А.Н. Евдокимов // Экологические проблемы промышленных городов: сб. научных трудов / под ред. Е.И. Тихомировой/ Саратов, 2011. -Ч. 1. -С. 278.

62. Савинова, И.В. Показатели энергетического обмена в долгосрочном эксперименте после введения метилфосфоната лабораторным мышам / И.В. Савинова, **О.М. Плотникова** // Экологические проблемы промышленных городов: сб. научных трудов / под ред. Е.И. Тихомировой/ Саратов: Саратовский гос. ун-т, 2011.- Ч. 1. -С. 289-290.

63. **Плотникова, О.М.** Экотоксикологический мониторинг в районе расположения объекта уничтожения химического оружия в г. Щучье Курганской области / О.М. Плотникова, М.А. Григорович, А.Н. Евдокимов // Экологические проблемы промышленных городов: сб. научных трудов / под ред. Е.И. Тихомировой. /Саратов: Саратовский гос. ун-т, 2011. Ч. 1. -С. 125-126.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ и АСТ	– аланин- и аспартатаминотрансферазы
АОС	– антиоксидантная система
АФГ	– альдегидофенилгидразоны
ВНСММ	– вещества низкой и средней молекулярной массы
ИИ	– индекс интоксикации
КК	– креатинкиназа

КрФ	– креатинфосфат
КФГ	– кетофенилгидразоны
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
МДА	– малоновый диальдегид
МФК	– метилфосфоновая кислота
НСТ	– нитросиний тетразолий
ОП	– олигопептиды
ПВК	– пировиноградная кислота, пируват
ПОБ	– перекисное окисление белков
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
СОД	– супероксиддисмутаза
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ФОС	– фосфорорганические соединения
ФП СРО	– функциональный показатель свободно-радикального окисления
ЭИ	– эндогенная интоксикация
$\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - $\text{♂}$ и $\text{♀}$	– фракции глобулинов  – символьное обозначение самцов и самок

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань, ул.Кремлевская, 18; КФУ, отдел аспирантуры ученому секретарю диссертационного совета Д212.081.08 Абрамовой З.И.

Тираж 100 экземпляров  
Отпечатано в редакционно-издательском центре  
Курганского государственного университета  
г. Курган, ул. Гоголя, 25.